

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diverzita ektomykorhizních hub
ve vybraných bučinách
Blanského lesa

Diplomová práce

Ing. Ondřej Hejna

Školitelka: Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.

České Budějovice

2013

Hejna O. (2013) Diverzita ektomykorhizních hub ve vybraných bučinách Blanského lesa. [Diversity of ectomycorrhizal fungi in selected beech stands in Blanský les. Mgr. Thesis, in Czech.] – 78 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The diversity and abundance of ectomycorrhizal fungi in three beech stands were compared during 2012 and 2013 years in two soil horizons. Individual ectomycorrhizal roots tips were morphologically and anatomically characterized. Representative morphotypes were identified by using molecular methods to confirm and verify ectomycorrhizal fungal species.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. prosince 2013

podpis

Poděkování:

Poděkovat bych chtěl především vedoucí mé diplomové práce Miloslavě Kavkové za cenné rady a doporučení, bez kterých by jistě tato práce nevznikla. Dále bych rád poděkoval svým rodičům za psychickou a finanční podporu. V neposlední řadě patří mé poděkování také Štěpánce Machové za gramatickou a jazykovou korekturu textu.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Ektomykorhizní symbióza	2
1.2	Diverzita ECM hub	3
1.3	Explorační typy	4
1.4	Studium diverzity ECM hub	7
1.5	Vliv diverzity ECM hub	10
1.5.1	Vliv diverzity ECM hub na hostitele	10
1.5.2	Vliv diverzity ECM hub na společenstva rostlin	10
1.6	Faktory ovlivňující diverzitu ECM hub	11
1.6.1	Druhové složení hostitelů	12
1.6.2	Stáří porostu	13
1.6.3	Hostitelské dřeviny	14
1.6.4	Vlastnosti půdy	14
2	Metodika	16
2.1	Výběr lokalit	16
2.2	Sběr vzorků	17
2.3	Zpracování vzorků	18
2.4	Hodnocení morfologických znaků	19
2.5	Anatomické znaky	20
2.6	Molekulární analýza	23
2.6.1	Příprava ECM špiček pro molekulární analýzu	23
2.6.2	Izolace DNA z morfotypů	23
2.6.3	Polymerázová řetězová reakce	24
2.6.4	Sekvenace DNA	25

2.7	Statistické vyhodnocení a použité způsoby zobrazení.....	26
3	Výsledky.....	28
3.1	Nalezené druhy	28
3.2	Druhov \acute{a} bohatost a Shannonův index	31
3.3	Četnost výskytu v závislosti na půdním horizontu, lokalitě a roce	32
3.4	Explorační typy.....	36
3.5	Četnost jednotlivých druhů	38
4.	Diskuze	42
4.1	Nalezené druhy, druhová bohatost a Shannonův index	42
4.2	Četnost výskytu ektomykorhiz v závislosti na horizontu, lokalitě a roce.....	43
4.2.1	Rok	43
4.2.2	Horizont.....	44
4.2.3	Lokalita.....	44
4.3	Explorační typy.....	45
4.4	Četnost jednotlivých druhů ECM hub	45
5	Závěr	47
6	Seznam literatury.....	48
7	Příloha	59
7.1	Příloha 1 - tabulky.....	59
7.2	Příloha 2 - protokoly	63
7.3	Příloha 3 - fotografie.....	65

1 Úvod

Říše hub je velice rozsáhlá a rozmanitá. Houby patří mezi absorptivní heterotrofní eukaryotické organismy získávající energii rozkladem složitých organických látek. Symbiotické houby tyto látky získávají od svých symbiotických partnerů, saprotrofické houby rozkladem odumřelé organické hmoty a parazitické houby od svých hostitelů. Nejen nutriční požadavky, ale i široký rozsah tvarů, životních forem a stylů života předurčuje houby k vysoké rozmanitosti a diverzitě (Gryndler *et al.*, 2004).

I když houbové organismy jsou předmětem systematického vědeckého bádání již od 19. století, je v říši hub stále ještě mnoho neobjasněných jevů. Z odhadovaných 1,5 miliónu druhů hub je doposud známo pouze přibližně 7 % (Kirk *et al.*, 2008). Zkoumání diverzity hub bývá obvykle velice náročné. První problém představuje velikost samotného organismu. Houbové organismy jsou obvykle tvořeny mikroskopickými vlákny mycelia pozorovatelné pouze pod mikroskopem. Jediné makroskopické objekty bývají plodnice hub, které se však vytváří jen u některých druhů a to jen v určitém období. Druhý problém představuje samotný výskyt, početnost a proměnlivost hub v čase a prostoru. Studium diverzity houbových společenstev může být pojato z více pohledů, ale vždy představuje multidisciplinární přístup (Smith & Read 2008).

Ve své práci jsem se zaměřil na komunity ektomykorhizních hub na kořenech buků během dvou let a to vždy v měsících září a říjen. Zajímalo mě, jaká je četnost a druhové spektrum ektomykorhizních hub na kořenech stejně starých buků na třech, z ekologického hlediska stejných, nebo velmi podobných lokalitách. Dále jsem porovnával četnost ektomykorhizních hub mezi humusovým a minerálním horizontem. Také jsem zkoumal, jak se četnost ektomykorhizních hub bude meziročně měnit, a které druhy ektomykorhizních hub jsou na vybraných lokalitách dominantní. Ektomykorhizní kolonizaci je možné hodnotit z mnoha hledisek, a tak mě také zajímalo, jaké bude zastoupení jednotlivých druhů v tzv. „exploračních typech mykohiz“ a jaké bude zastoupení těchto exploračních typů v závislosti na lokalitě roku a půdním horizontu.

1.1 Ektomykorhizní symbióza

Ektomykorhizní houby (dále jen ECM houby) jsou jednou ze skupin hub žijící v symbiotickém vztahu s dřevinami. Tito partneři houbám poskytují nasyntetizované organické látky a houby jim na oplátku zprostředkovávají lepší dostupnost vody a minerálních látek. Takovéto asociace jsou v přirozených ekosystémech běžným jevem (Smith & Read 2008).

Jednou z nejvýznamnějších skupin symbiotických hub jsou ECM houby. Tato skupina hub tvoří jedno ze základních mutualistických spojení mezi houbami a terestrickými rostlinami. Na tomto vztahu se podílí velké množství druhů ECM hub z oddělení Basidiomycota, Ascomycota společně se stovkami převážně dřevnatých rostlin. Pro ektomykorhizní symbiózu jsou charakteristické tři hlavní znaky odlišující tuto skupinu od ostatních mykorhizních spojení: tvorba hyfálního pláště obklopující konce kořinek rostlin; prorůstání mycelia do mezibuněčných prostor rhizodermálních buněk a buněk primární kůry; růst mycelia od hyfálního pláště a tvorba specifických struktur emanačními hyfami. Prostorová síť mycelia v mezibuněčných prostorech buněk kořene se nazývá Hartigova síť (Gryndler *et al.*, 2004).

Vazba mezi ECM druhy hub a druhy dřevin vykazuje různou specifitu. Různé druhy stromů dokáží vytvářet symbiózu se stovkami druhů ECM hub (Molina *et al.* 1992). Ze strany houbového organismu je vazba poněkud těsnější. Obvykle je konkrétní druh schopen kolonizovat kořeny jen několika druhů dřevin, výjimkou jsou některé ubikvitní druhy ECM hub například *Cenococcum geophilum*, který je schopen vytvářet spojení s obrovským množstvím druhů dřevin (Agerer 1995). Naopak existují i rody, které jsou typické vazností pouze na jeden konkrétní druh dřeviny. Mezi takovéto specificky vázané rody je možno zařadit například *Suillus* nebo *Rhizopogon* (Kretzer *et al.*, 1996).

Nejvýznamnější ekologickou úlohu hraje ektomykorhizní symbióza v boreálních lesích a lesích mírného pásu. Můžeme ji ale také nalézt v subtropických a tropických oblastech (Wang & Qui 2006).

1.2 Diverzita ECM hub

Studium druhové variability se zabývá druhy vyskytující se v určitém čase na určitém místě. Druhová variabilita ECM hub je ovlivněná řadou faktorů jako například ekologií stanoviště, věkem a fitness symbiotické dřeviny. Protože ECM houby netvoří jen ektomorfofotypy na kořenech dřevin, ale i jiné struktury (mycelium, plodnice, rhizomorfy, sklerocia apod.) není v podstatě možné podchytit ani kvalitativně a ani kvantitativně diverzitu ECM hub u vzrostlých stromů. Proto, pokud je pojednáváno o druhové diverzitě ECM hub, je třeba konkrétní výsledky vztahovat ke konkrétnímu stanovišti, způsobu odběru, zpracování a hodnocení vzorků, a také k termínu odběru vzorku. Ektomykorhizní špičky jsou funkční obvykle po dobu třech týdnů a neustále jsou tvořeny na kořenech stromů nové špičky stejného nebo jiného druhu ECM hub (Wubet *et al.*, 2012; Bubner *et al.*, 2013).

Proměnlivost a hojnost jednotlivých druhů ECM hub udává konkrétní strukturu společenstva. Druhová diverzita ECM hub je důležitou složkou lesních ekosystémů (van der Heijden 1998). Interakce mezi jednotlivými druhy ECM hub se podílí na klíčových rolích v koloběhu živin, ukládání uhlíku a produktivity ekosystému (Koide *et al.*, 2011).

O bohatosti a počtu ECM hub si lze udělat představu ze studií shrnující doposud popsané druhy (Molina *et al.*, 2002; Bougher 1995; Brundrett *et al.*, 1996; de Roman *et al.*, 2005; Agerer 2006; Rinaldi *et al.*, 2008). Poslední jmenovaná práce shromažďuje popis 84 rodů Ascomycet, 252 rodů Basidiomycet a 5 rodů Glomeromycet. 122 rodů je podloženo dvěma a více důkazy, 114 rodů je založeno na jednom pozorování. Zbývajících 115 rodů je řazeno k ECM houbám pouze na základě pozorování korelujícího výskytu plodnic a určitých druhů rostlin (Rinaldi *et al.*, 2008).

Odhady celkového počtu druhů ECM hub se do jisté míry liší dle autorů. Malloch *et al.*, (1980) byl prvním, kdo se pokusil odhadnout celosvětovou bohatost druhů ECM hub. Jeho odhad byl cca 5000 druhů. Molina *et al.*, (1992) odhadoval podle podobných kritérií jako předchozí autor. Jeho odhad byl cca 5400 druhů. Další publikované odhady byly 10 000 druhů (Brussaard *et al.*, 1997), 7000 – 10 000 druhů (Taylor & Alexander 2005). Na základě studia ECM špiček odhadl Agerer (2006) 5800 druhů ECM hub ve 184 rodech, viz příloha 1 Tab. 1. Zatím poslední a pravděpodobně i nejpřesnější odhadovaná hodnota je 7750 druhů hub (Rinaldi *et al.*, 2008).

Doposud známé ECM houby charakteristické vytvářením symbiotického svazku s buky (*Fagus sylvatica*) jsou zaneseny do přílohy 1 Tab. 2. Předložený list jistě nezahrnuje všechny ECM houby v symbiotickém spojení s *Fagus sylvatica*. Celkový počet druhů je odhadován v trojciferných číslech. Předložený seznam obsahuje necelých 80 druhů a byl vytvořen z dostupných seznamů ECM hub (Agerer & Rambold 2004–2013; de Roman *et al.*, 2005; Agerer 1987–2008). Konkrétní výskyt druhů ECM hub lze zatím jen velice těžko odhadovat.

1.3 Explorační typy

Velká diverzita ECM hub vyžaduje cílenou klasifikaci podle morfologických a anatomických znaků. Některé charakteristické struktury mohou ukazovat na různé úlohy těchto hub v ekologii. Takové struktury představují hlavně emanační hyfy a rhizomorfní provazce vytvářející kontaktní a transportní oblast houbového pláště a okolní půdy. Agerer (2001) na základě množství emanačních hyf, přítomnosti a tvaru rhizomorf rozlišil několik „exploračních typů“ zobrazených na Obr. 1. Předpokládá se, že ECM houby se stejným exploračním typem mají velice podobnou strategii v získávání živin (Agerer 2001).

- **Kontaktní explorační typ („Contact exploration type“)** – Tento typ charakterizuje ektomykorhizy s hladkým pláštěm a malým množstvím emanačních hyf. Mykorhizní špičky jsou v těsném kontaktu se substrátem. Charakteristické rody pro tento explorační typ jsou *Balsamia*, *Chroogomphus*, *Lactarius*, *Leucangium*, *Russula*, *Tomentella* a *Tuber* s krátkými cystidii (Agerer 2001).
- **Explorační typ s krátkými hyfami („Short-distance exploration type“)** – Morfotypy tohoto exploračního typu jsou charakteristické rozsáhlým obalem emanačních hyf a absencí rhizomorf. Typické rody tohoto typu jsou *Byssocorticium*, *Cenococcum*, *Descolea*, *Elaphomyces*, *Genea*, *Humaria*, *Inocybe*, *Sphaerosporella*, *Sphaerozone*, *Rozites*, *Tomentella*, *Tricharina*, *Tuber* s dlouhými cystidii a *Tylospora* (Agerer 2001).
- **Explorační typ se středně dlouhými hyfami („Medium-distance exploration type“)** – Tento typ se rozděluje na tři podskupiny podle charakteru jejich rhizomorf.

- **Třásnitý explorační podtyp („Fringe exploration subtype“)** – ECM houby tohoto exploračního typu jsou charakteristické vějířovitými emanačními hyfami a rhizomorfami, které se větví a následně zase spojují. Povrch rhizomorf je často pokrytý emanačními hyfami prostupující do okolního substrátu. Typická rhizomorfa je uniformní a volná, výjimečně theleporoidního¹, ramaroidního² a phlegmacioidního³ typu. Jednotlivé typy rhizomorf jsou zobrazeny na Obr. 2. Typické rody tohoto podtypu jsou *Amphinema*, *Cortinarius*, *Entoloma*, *Laccaria*, *Lyophyllum*, *Piloderma* a *Tricholoma* (Agerer 2001).

- **Polštářovitý explorační podtyp („Mat exploration subtype“)** – Jednotlivé mykorrhizy tohoto exploračního typu mají omezený rozsah růstu. Rhizomorfy jsou obvykle nediferencované nebo typu jednotné a volné, theleporoidní (vnější hyfy tenčí než centrální) a výjimečně i theleporoidní s nody. Typické rody tohoto podtypu jsou *Bankera*, *Geastrum*, *Gomphus*, *Hydnellum*, *Hysterangium*, *Phellodon*, *Piloderma*, *Ramaria* a *Sarcodon* (Agerer 2001).

- **Hladký explorační podtyp („Smooth exploration subtype“)** – Pro tento podtyp je charakteristický hladký povrch pláště bez emanačních hyf. Rhizomorfy jsou vnitřně nediferencované nebo s centrálním jádrem z tlustých hyf. U tohoto podtypu můžeme najít rhizomorfy, které jsou jednotné a kompaktní: theleporoidní a výjimečně russuloidní⁴. Rody typické pro tento podtyp jsou *Albatrellus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Polyporoletus*, *Thaxterogaster*, *Thelephora*, *Tomentella* a *Tricholoma* (Agerer 2001).

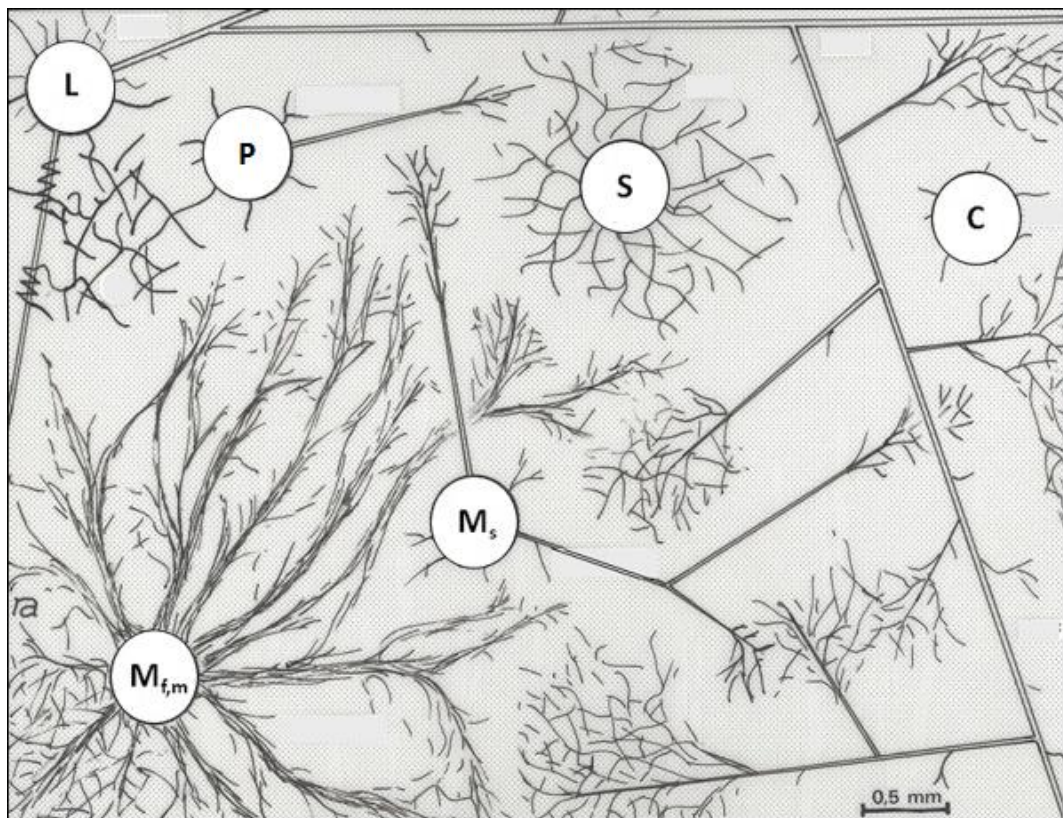
¹ Theleporoidní – skupina morfologicky i taxonomicky podobných ECM morfotypů, jež je z hlediska morfologie reprezentována rodem *Thelephora* (Agerer 1999)

² Ramaloidní – skupina morfologicky a taxonomicky podobných ECM hub, která je morfologicky reprezentována rodem *Ramaria* (Agerer 1999)

³ Phlegmacioidní – skupina morfologicky a taxonomicky podobných ECM hub morfologicky charakteristická plegmacioidní větví druhu *Cortinarius* (Agerer 1999)

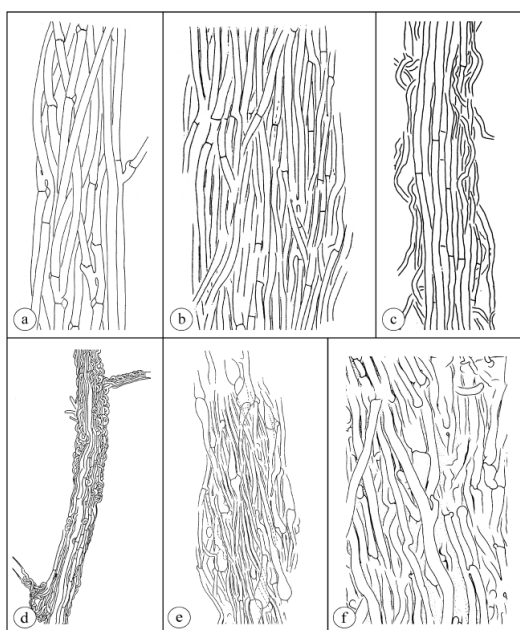
⁴ Russuloidní – skupina morfologicky i taxonomicky podobných ECM morfotypů, jež je z hlediska morfologie reprezentována rodem *Russula* (Agerer 1999)

- **Explorační typ s dlouhými rhizomorfami („Long-distance exploration type“)** – Tento explorační typ je charakteristický spíše hladkým pláštěm s menším počtem vysoce diferencovaných rhizomorf boletoidního typu⁵ zobrazených na Obr. 3. Typické rody jsou *Boletinus*, *Boletus*, *Chamonixia*, *Gyrodon*, *Gyroporus*, *Leccinum*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Tylopilus* a *Xerocomus* (Agerer 2001).
- **Slizákový explorační typ (“Pick-a-back exploration type“)** – Tento typ je typický pro čeleď Gomphidiaceae (slizákovité). Rody *Gomhidius* a *Chroogomphus* tvoří typické mykorhizy, výjimečně však mohou vytvářet i asociace s ostatními ECM houbami. *Gomhidius* a *Chroogomphus* dokážou prorůst do rhizomorf rodu *Suillus* a *Rhizopogon* a vytvořit tento charakteristický explorační typ. Rhizomorfy jsou thelephoroidního nebo phlegmacioidního typu (Agerer 2001).

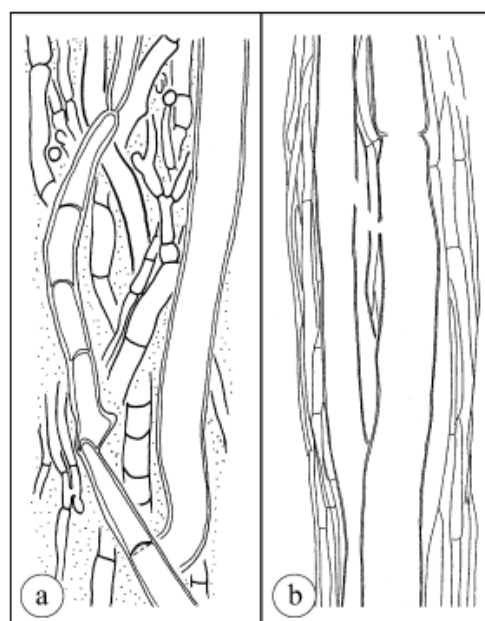


Obr. 1.: Schématické znázornění exploračních typů podle Agerer (2006) C – kontaktní typ, S – typ s krátkými hyfami, M_s – typ se středně dlouhými hyfami: třásnitý podtyp, M_f - typ se středně dlouhými hyfami: polštářovitý podtyp, M_m - typ se středně dlouhými hyfami: hladký podtyp, L - typ s dlouhými rhizomorfami, P - slizákový typ

⁵ Boletoidní – skupina morfologicky a taxonomicky podobných ECM hub, která je morfologicky reprezentována rodem *Boletus* (Agerer 1999)



Obr. 2: Různé typy rhizomorf podle Agerer (2006)
 a – nespojitý typ, b – kompaktní,
 c – telephoroidní s vnějšími hyfami tenčími než
 centrální, d – telephoroidní s nody,
 e – ramaroidní, f – phlegmacioidní



Obr. 3: Různé typy rhizomorf podle Agerer
 (2006) a – russuloidní, b – boletoidní

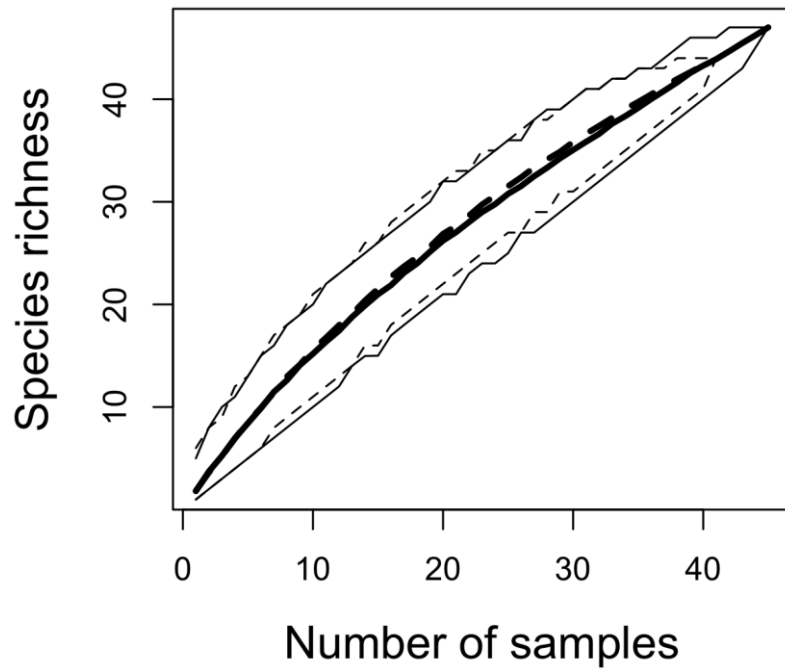
1.4 Studium diverzity ECM hub

Studium diverzity ECM hub může být pojato několika různými způsoby. Jeden ze přístupů je hodnocení ektomykorhizních společenstev z hlediska identifikace plodnic ECM hub. Ačkoli seznamy plodnic ECM hub, které jsou dnes široce rozšířeny, není možné z těchto informací získat přesné odhady diverzity ECM hub. Novodobé studie diverzity ECM hub založené na kombinaci sběru plodnic, určování morfologických a anatomických znaků symbiotického spojení a molekulárních analýz naznačují hluboký rozkol mezi dřívějšími výsledky založenými pouze na sběru plodnic. Tento problém je možné vysvětlit skutečností, že druhy ECM hub produkující plodnice nemusí být dominantními druhy v půdních horizontech. Dále také nelze opomenout fakt, že některé ECM houby tvoří plodnice jen vzácně nebo vůbec (Grillo & Venora 2011).

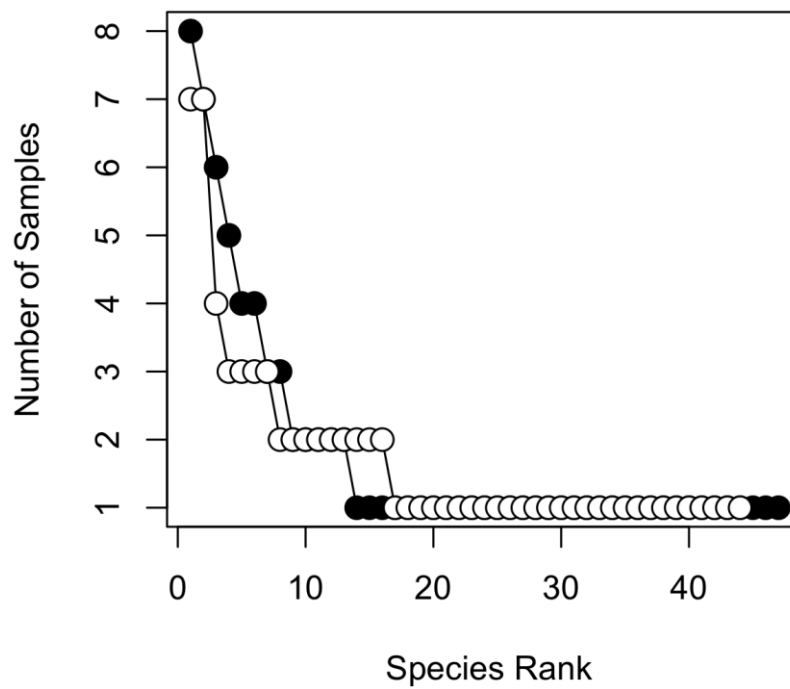
Kromě studia diverzity na základě sběru plodnic se již po tři desetiletí provádí identifikace ECM hub pomocí morfologických a anatomických znaků mykorhizního spojení. Tento přístup může být obtížný a časově náročný (Agerer 1987 - 2008). Navíc u řady ECM

morfortypů není stále jasné jakými konkrétními druhy ECM hub je tvořen. Mají pak rodové názvy, jako například *Fagirhiza*, pakliže je jejich výskyt spjat s bukem, nebo *Piceirhiza* na smrku nebo *Pinirhiza* na borovicích. Také neexistuje žádný určovací materiál, který by shrnoval morfologický a anatomický popis všech ECM morfortypů vyskytujících se na konkrétních dřevinách. Proto od 80. let minulého století s rozvojem molekulárních metod, bylo publikováno mnoho studií, kde jednotlivé ECM morfortypy jsou zdokumentovány na základě anatomických a morfologických znaků a houbový organismus, který se na jejich tvorbě podílí je identifikován pomocí molekulárních metod. Pomocí těchto metod je možné ještě více odhalit z časové a prostorové rozmanitosti ECM hub na konkrétních lokalitách. Podle charakteru studie se používají různé PCR metody, sekvenuje se primárně ITS rDNA. Vzhledem k houbovým organismům převládá použití primerů ITS1F a ITS4 (Schoch *et al.*, 2012). Je rovněž možné amplifikovat specificky navržené primery pro určitou taxonomickou skupinu, a není nutné používat vždy jadernou DNA, jsou známy specificky navržené primery pro úseky genů mtDNA například pro rod *Amanita* sp. (Dentinger *et al.*, 2011), *Paxillus* sp. (Hedh *et al.*, 2009) a jiné. Kromě sekvenování jednotlivých morfortypů se informace o složení ECM hub ve vzorku dají získávat použitím metody DGGE nebo pyrosekvenováním (Wubet *et al.*, 2012; Bubner *et al.*, 2013).

Struktura ECM společenstva je často charakteristická výskytem dominantních druhů, ke kterým jsou přidruženy velké počty druhů s řídkým výskytem (Morris *et al.*, 2008). Molekulární metody se významně podílejí na odhalení těchto vzácnějších druhů a mění tak i možný výsledek odhadu diverzity ECM hub daného místa. Fenomén vzácných druhů ECM hub naznačili ve své studii autoři Branco & Ree (2010). Ti popsali charakteristickou strukturu ECM společenstva jako dominanci malého počtu druhů doplněných velkým počtem druhů vzácných. Obr. 4 ukazuje, že počet odebraných vzorků se významně podílí na počtu nalezených druhů ECM hub (Branco & Ree 2010). Na Obr. 5 je znázorněn nárůst dalších identifikovaných druhů v závislosti na přidávaných vzorcích (Branco & Ree 2010). Podobné studie z minulosti naznačily podobné výsledky (Taylor 2002).



Obr. 4: Závislost identifikovaných druhů na počtu odebraných vzorků (Branco & Ree 2010)



Obr. 5: Nárůst dalších identifikovaných druhů v závislosti na přidávaných vzorcích (Branco & Ree 2010)

1.5 Vliv diverzity ECM hub

1.5.1 Vliv diverzity ECM hub na hostitele

Diverzita ECM hub se v některých studiích ukázala jako jeden z faktorů ovlivňující zdatnost hostitelských rostlin. Zvýšení počtu druhů ECM hub vedl k zlepšení růstu semenáčků. Tuto teorii pozitivně ověřil Jonsson *et al.*, (2001), který aplikací tekutého inokula s osmi druhy ECM hub dokázal zvýšit jejich přírůstky. Podobný experiment se semenáčky břízy prokázal zvýšení jejich fitness (Baxter & Dighton 2001).

Pravděpodobné vysvětlení zvýšení fitness je možné odůvodnit různorodostí pozitivních efektů jednotlivých druhů ECM hub. Například jednotlivé druhy hub se mohou lišit ve způsobu zpřístupnění a příjmu fosfátů, které pak putují do hostitelských rostlin (Dighton *et al.*, 1990; Qu *et al.*, 2009). Různé způsoby v příjmu a zpřístupnění některých látek ECM houbami pravděpodobně vedou k lepší dostupnosti těchto látek pro hostitelské rostliny. Případný pozitivní efekt může mít za následek zlepšení zdatnosti konkrétních rostlin a zvýšení jejich konkurenceschopnosti v daném prostředí. Dále se na zvýšení pozitivního efektu může podílet i různorodost metabolických přeměn jednotlivých druhů ECM hub (Kernaghan 2005).

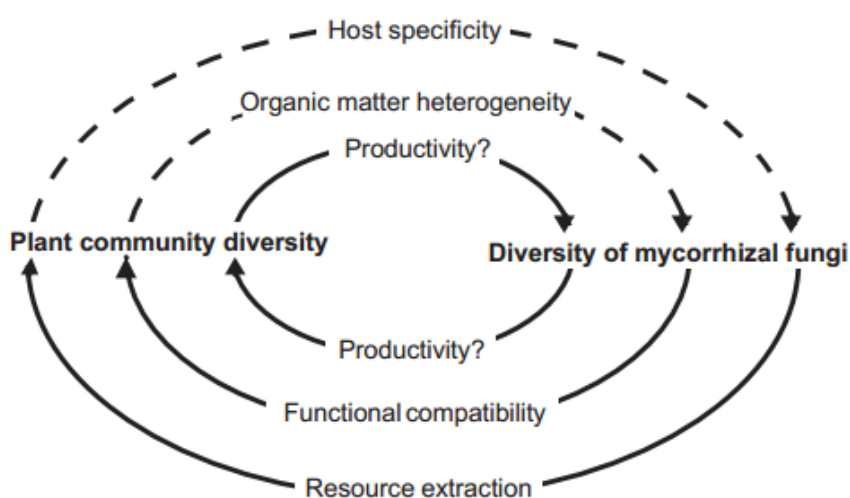
V neposlední řadě lze předpokládat, že diverzita ECM hub může nepřímo ovlivňovat produktivitu hostitelských rostlin. Větší diverzita ve společenstvu hub produkuje větší množství mycelia a spor, které jsou poté v prostředí častější a zvyšují šanci na kolonizaci hostitelských rostlin a projevu jejich pozitivního efektu (Naeem *et al.*, 1994).

1.5.2 Vliv diverzity ECM hub na společenstva rostlin

Různorodost ECM hub ovlivňuje diverzitu populací a společenstev dřevin. Bylo prokázáno, že mycelium ECM hub je schopné se podílet na vytvoření mykorhiz na různých druzích hostitelů a spojit je pomocí mycelia. V rámci této myceliární sítě dochází k transportu energeticky hodnotných látek, jak mezi stejnými, tak i různými druhy hostitelských rostlin. Tímto způsobem se potlačuje vzájemná konkurence jednotlivých rostlin a zvyšuje diverzita ekosystému (Simard *et al.*, 1997). Vzájemný vztah mezi

diverzitou hub a rostlin je určitým způsobem provázán pravděpodobně i z dalších důvodů. Vzájemná provázanost diverzity rostlin a hub je zobrazena v jednoduchém modelu na Obr 6. Vysoké diverzita hub je často ve shodě s vysokou diverzitou rostlin. Dnes je běžně přijímán fakt, že druhová diverzita ECM hub je možná odhadnout na základě druhové diverzity hostitelských rostlin a naopak (Schmit *et al.*, 2005).

Za předpokladu, že většina nebo alespoň část rostlinných druhů nebude schopná hostit široké množství ECM hub, dominantní druhy patrně získají další výhodou vedoucí k poklesu diverzity prostředí (Kernaghan 2005).



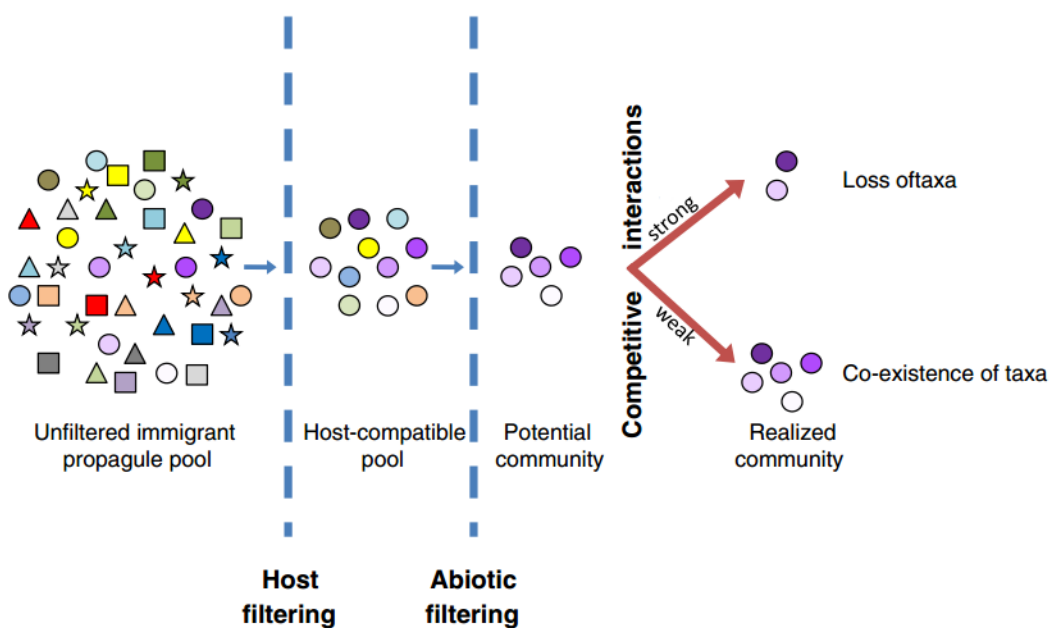
Obr. 6: Model vzájemného vztahu mezi diverzitou rostlin a hub (Kernaghan 2005)

1.6 Faktory ovlivňující diverzitu ECM hub

Diverzitu ECM hub ovlivňuje celá řada faktorů. Některé významné vlivy již byly odhaleny, nicméně většina pravděpodobně zůstává zatím skryta. Doposud byl prokázán efekt například: druhové specifity (Kernaghan *et al.*, 2003), stáří porostu (Smith *et al.*, 2002), produktivity hostitelů (Druebert *et al.*, 2009), typu půd (Gehring *et al.*, 1998), úživnosti půdy (Kranabetter *et al.*, 2009), kontaminace těžkými kovy (Markkola *et al.*, 2002), vápněním (Rineau *et al.*, 2010), zvýšenou koncentrací přízemního ozónu (Grebenc & Kraigher 2007), překyselením půd (Anderson & Cairney 2007), zvýšeným obsah oxidu uhličitého (Rey & Jarvis 1997), zvýšeným obsah dusíku (Wallenda & Kottke 1998), kácením stromů (Buée *et al.*, 2005), zvýšeným pohybem lidí (Waltert *et al.*, 2002), urbanizací oblasti (Baxter *et al.*,

1999), požárem (Anderson *et al.*, 2007), býložravců (Gehring & Bennett 2009), holoseče (Grebenc *et al.*, 2009) a další.

Koide *et al.*, (2011) ve své studii navrhl obecný model popisující druhové struktury společenstev ECM hub na základě biotických, abiotických faktorů prostředí a mezidruhové konkurence. Koideho model je schematicky znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7: Grafické znázornění výběru ECM hub v pomyslných společenstvech pod vlivem biotických, abiotických faktorů a mezidruhové konkurence (Koide *et al.*, 2011)

1.6.1 Druhové složení hostitelů

Společenstva ECM hub jsou ovlivňována celou řadou biotických a abiotických faktorů. Jedním z nejvýznamnějších faktorů je společenstvo rostlin a jeho složení. Vzájemná komunikace mezi hostitelskou rostlinou a ECM houbou není přesně objasněna. Není ani podrobně objasněn mechanismus rozpoznávání a kontroly. Doposud se předpokládá, že vzájemná komunikace probíhá za pomoci chemických látek, jako jsou například různé sekundární metabolity hub, rostlinné flavonoidy a rostlinné hormony syntetizované houbami (Vierheilig & Piché 2002, Podila 2002).

U ECM hub je symbiotické spojení dáno většinou rodově (kompatibilita rodu houby s rodem rostliny), nicméně v některých případech je realizováno pouze při komunikaci konkrétních druhů (kompatibilita druh houby s druhem rostliny) Molina *et al.*, (1992). Užší vazbou ve výběru symbiontů jsou typické listnaté stromy. Naopak jehličnany obvykle vytvářejí spojení s širším spektrem ECM hub (Cullings *et al.*, 2000). Některé studie porovnávající diverzitu ECM hub ve smíšeném lese odhalily širší paletu hub na jedlích a smrcích, naopak nižší na břízách, borovicích a topolech (Kernaghan *et al.*, 2003).

Společenstva ECM hub a dřevin jsou v lesích mírného pásma úzce provázána. Mnoho studií potvrzuje specifickou rodovou vazbu i druhovou vazbu jednotlivých dřevin a ECM hub (Feris *et al.*, 2000). Není tedy překvapením pozitivní korelace diverzity ECM hub na rozmanitosti lesního porostu (Kernaghan *et al.*, 2003). Větší diverzita ECM hub byla prokázána ve smíšených porostech oproti monokulturám (Jones *et al.*, 1997).

1.6.2 Stáří porostu

Diverzita ECM hub je také do jisté míry ovlivněna věkovou různorodostí porostu. Některé druhy hub jsou vázány jen na semenáčky, jiné naopak na dospělé stromy. Větší druhová rozmanitost byla pozorována ve starších porostech (Smith *et al.*, 2002). Nicméně výraznější různorodost ECM hub ve starších porostech může být též vysvětlena změnou půdních podmínek, které se vlivem stáří porostu mění a pro mnohé ECM houby se mohou takové podmínky stát vhodnější.

Podobné schéma lze pozorovat i v bučinách, kde větší diverzita hub je vázána na starší porosty. Semenáčky buků obvykle hostí menší množství ECM hub než dospělé stromy (Tratnik & Pohleven 1995). Některé novější studie naopak výraznější změnu nezaznamenaly. Druhová diverzita se významně neměnila v závislosti na stáří bukového porostu. Změny diverzity byly řízeny spíše vlastnostmi půdy a orientací svahu na zkoumaném území. di Marino *et al.*, (2008) ukázala na větší vliv abiotických faktorů, které ovlivňují diverzitu v bukových porostech více než stáří porostu.

1.6.3 Hostitelské dřeviny

Bylo prokázáno, že diverzita ECM hub je do jisté míry pozitivně korelována s produktivitou lesního ekosystému (Zak *et al.*, 2003). Přibližně 20–30 % asimilátů nasyntetizovaných rostlinou končí v myceliu symbiotických hub (Söderstöm 2002). Obecně se předpokládá, že při strádání hostitelských stromů se spektrum i kolonizace ECM hub bude snižovat. Konkrétní studie pokles diverzity a kolonizace hub potvrdily jen v některých případech. U borovic, kterým byla odebrána část jehlic, a tím snížena jejich produktivita, nedošlo ke snížení množství kolonizace a diverzity ECM hub. Jediný pozorovatelný úkaz bylo snížení počtu plodnic (Kuikka *et al.*, 2003). Dehlin *et al.*, (2004) ve svém pokusu snižoval produktivitu stíněním hostitelských stromků, ani on však na kořenech nepozoroval klesající množství kolonizace nebo diverzity ECM hub. Odlišný výsledek byl pozorován v podrostu bříz. Stíněné semenáčky reagovaly na větší množství světla zvýšením kolonizace ECM hub na jejich kořenech (Cheng *et al.*, 2005).

Podobná studie byla prováděna i v bukových porostech. Menší stromky buků byly cíleně zastíněny nebo kroužkovány. I přesto, že jsou semenáčky buků dobře adaptovány na zastínění, došlo vlivem zastínění a kroužkování ke snížení četnosti a diverzity ECM hub. Kolonizace byla redukována na 10 % kořenového systému. Naopak sluněné stromky buků vykazovaly 74 % kolonizace kořenového systému. Vyšší kolonizace ECM houbami vedla i k jejich větší diverzitě. Vitalita ovlivněna nebyla. Naopak kroužkování stromků překvapivě nevedlo k snížení kolonizace ani diverzity ECM hub (Druebert *et al.*, 2009).

1.6.4 Vlastnosti půdy

Půdní prostředí je pravděpodobně druhým nejvýznamnějším faktorem ovlivňující diverzitu ECM hub (Erland & Taylor 2002). Tento fakt je podložen tím, že různé druhy ECM hub vyžadují odlišné půdní podmínky. Půdní faktory, které ovlivňují výskyt ECM hub, jsou například: teplota, půdní vlhkost, obsah dusíku, pH půdy, obsah organických látek, fenolických látek a další (Erland & Taylor 2002). V rozsáhlé studii hub listnatých lesů (Rühling & Tyler 1990) byly jako dva nejvýznamnější půdní faktory určeny obsah a typ organické hmoty a pH reakce půdy. Tento výsledek může být vysvětlen různě zachovalou schopností rozkladu organických látek ECM houbami za použití vlastního enzymatického aparátu. Řada těchto enzymů je závislá na pH reakci prostředí.

Jednotlivé půdní horizonty se výrazně liší ve svých vlastnostech. Proto i jednotlivá společenstva ECM hub se mohou napříč půdními horizonty výrazně lišit. Hlavním rozdílem dělící tyto skupiny hub je odlišnost ve schopnosti získávat živiny (Dickie *et al.*, 2002; Tedersoo *et al.*, 2003). Konkrétní studie prováděné v listnatých lesích potvrdily výraznou odlišnost ve druhovém složení ECM hub v jednotlivých půdních horizontech. Největší množství a druhová diverzita ECM hub je pozorována ve svrchním organickém horizontu (Buée *et al.*, 2007).

Jedním z dalších významných půdních faktorů je obsah vody v půdě. Diverzita ECM hub je tímto faktorem významně ovlivněna. Tento fakt je dán tím, že existuje řada ECM hub s rozdílnými požadavky na půdní vodu. Obecně se ECM houby výrazně podílejí na zprostředkování půdní vody hostitelským rostlinám (Davies *et al.*, 1996). Dokonce se předpokládá, že i některé areály výskytu buků jsou přímo závislé na dodatečném zvýšení příjmu vody ECM houbami (Ebert 1996). Konkrétní studie provedená na stromcích buku ukázala výraznou změnu diverzity ECM hub na kořenových systémech při změně půdní vlhkosti. Rozsah kolonizace nebyl znatelně změněn, došlo však ke změně druhů ECM hub (Shi *et al.*, 2002). Některé druhy hub se při vystavení suchému prostředí vytratily, naopak jiné druhy se objevily (Shi *et al.*, 2002). Zhoršená vitalita stromů nebyla pozorována (Shi *et al.*, 2002). Nevětšího rozsahu v kolonizaci kořenů v suché půdě dosáhl kosmopolitní druh *Cenococcum geophilum*. V bukových porostech bývá obvykle dominantním druhem. Často je nalézán již na kořenových systémech semenáčků buků. Některé studie potvrdily schopnost tohoto druhu zvyšovat rezistenci hostitelských stromů vůči suchu (di Pietro *et al.*, 2007). Vzhledem k velkému rozšíření tohoto druhu není překvapivá ani jeho široká genetická diverzita (Jany *et al.*, 2002).

V neposlední řadě jsou ECM houby v půdě ovlivňovány i ostatní půdní organismy. Významně se jeví interakce s některými půdními mikroorganismy. Například bylo potvrzeno usnadnění mykorhizní kolonizace pomocí některých bakterií (Garbaye 1994) nebo vliv půdní fauny na zvýšení kolonizace a diverzity ECM hub (Gehring & Whitham 2002).

2 Metodika

2.1 Výběr lokalit

Půdní vzorky byly odebírány na třech lokalitách v rámci chráněné krajinné oblasti Blanský les. Všechny tři lokality zobrazené na Obr. 8 se rozkládají na severovýchodním hřebeni mezi obcemi Mříč a Horní Chrášťany. Tento hřeben se táhne přes vrcholy Kluk, Haberský vrch, Švelhán, Střední hora, Skalka, Vysoká Běta a Chrášťanský vrch. Pokusné lokality byly pojmenovány podle nejbližších vrcholů. Důraz při výběru lokalit byl dán na jejich podobnost. Všechny tři lokality leží v mírném svahu. Stromové patro je u všech tří lokalit tvořeno bukovou monokulturou o přibližně stejném stáří stromů. Podrost je charakteristický listovým opadem řídké prostoupeným semenáčky buků. Ani na jedné lokalitě se nevyskytují v podrostu trávy.

- **Švelhán** (48° 56' 49" S, 14° 18' 32 "V)

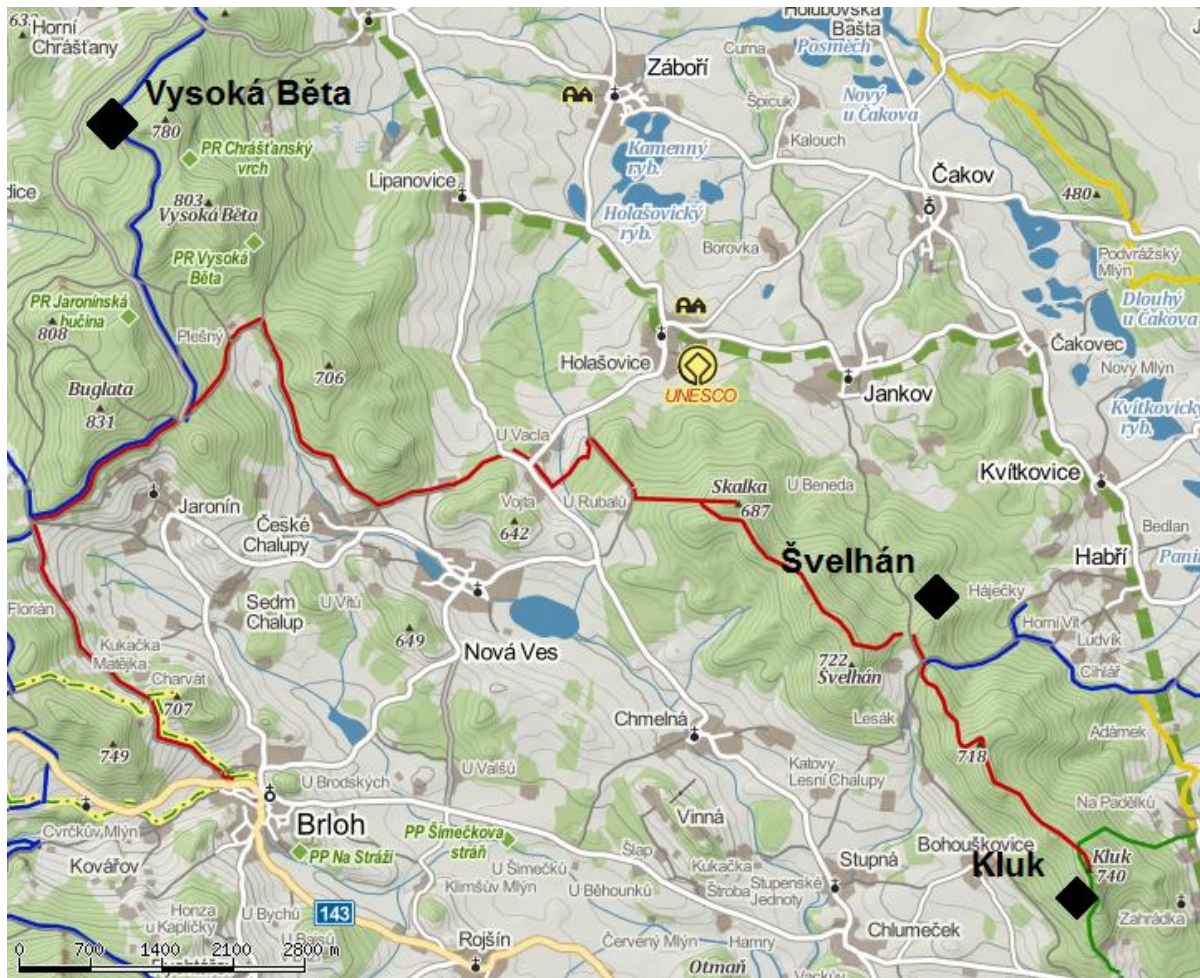
Lokalita se nachází 1 km od vrcholu Švelhán (721 m. n. m.) pod cestou Jankovská. Místo je charakteristické svahovitým terénem s porostem buku obklopeným smrkovou monokulturou. Lokalita se nachází v nadmořské výšce přibližně 620 m. n. m. a leží na severním svahu. Ve spodní části probíhala v minulých letech těžba dřeva.

- **Kluk** (48° 55' 18" S, 14° 19' 44" V)

Lokalita se rozprostírá na svahu hory Kluk (740 m. n. m.) přibližně 300 metrů pod vrcholem v nadmořské výšce přibližně 690 m. n. m. Místo je orientováno na jižním svahu směrem k obci Mříč. Od ostatních vybraných oblastí si liší o něco větší suťovitostí terénu. Lokalita je obklopena smrkovou monokulturou a vyskytuje se zde i několik statnějších buků.

- **Vysoká Běta** (48° 59' 22" S, 14° 11' 53" V)

Lokalita se nachází na svahu Chrášťanského vrchu (780 m .n. .m.) a Vysoké Běty (803 m. n. m.). Místo je situováno přibližně 1,5 km od obce Horní Chrášťany mezi cestami Jasanová a Prostřední v nadmořské výšce přibližně 660 m n. m. Nachází se zde svah orientovaný na severozápad.



Obr. 8: Mapa části Blanského lesa s vyznačenými lokalitami sběru, kosočtverce odzdoła nahoru značí lokality Kluk, Švelhán a Vysoká Běta

2.2 Sběr vzorků

Na každé lokalitě byly náhodně odebírány půdní vzorky. Místo pro odběr bylo určeno pomyslnou sítí a vygenerováním náhodného čísla určující místo odběru. Odebírání vzorků probíhalo půdní sondou válcovitého tvaru přibližně do hloubky 15 cm. Následně byla půda

vizuálně rozdělena na část humusovou a minerální. Jednotlivé části byly označeny a uloženy do dvou sáčků. Po návratu z odběru byly sáčky vždy uloženy do chladicího zařízení (4 °C) nebo rovnou zpracovány v laboratoři. ECM houby je nutné zpracovat v co nejkratší době, jelikož ECM špičky podléhají rychlé degradaci. Po určité době dochází k výrazným změnám vzhledu (Kjøller *et al.*, 2007; Suz *et al.*, 2008).

Odběr vzorků probíhal ve dvou letech v rámci měsíců září a říjen. V roce 2012 bylo odebráno 16 půdních vzorků z lokality Švelhán, 20 z lokality Kluk a 16 z lokality Vysoká Běta. V roce 2013 bylo sebráno 20 půdních vzorků z lokality Švelhán, 14 z lokality Kluk a 20 z lokality Vysoká Běta. Vždy polovina vzorků z každého odběru bylo humusového resp. minerálního půdního horizontu.

2.3 Zpracování vzorků

Ihned po návratu z odběru byly vzorky uloženy do chladicího zařízení nebo okamžitě zpracovány. Uložení v chladu (4 °C) trvalo maximálně několik dní, aby nedošlo k degradaci vzorku. Pracovní postup začínal přesypáním zeminy s kořínky buků do velkých kádinek s vodou. Do vody byla přidána kapka detergentu zajišťující méně destruktivní odstranění půdních částic z kořenů a ECM špiček. Po uplynutí přibližně půl hodiny byla kádinka vylita na soustavu sít s velikostí ok 0,315 mm a 0,5 mm. V horním sítu s největší velikostí ok byl substrát lehce promýván vodou s důrazem na co nejmenší poškození ECM špiček. Větší shluky kořenů a zeminy byly v případě nutnosti nechány odmočit ve vodě s detergentem. V průběhu promývání byly viditelné kořínky odebírány pinzetou do kádinky s vodou. Tímto způsobem byl propláchnut celý půdní vzorek. Pro větší přesnost lze síta prohlédnout pod binolupou a odebrat i odlomené ECM špičky (Kjøller *et al.*, 2007).

Konečná fáze očištění probíhá pod binolupou. Promyté kořínky z kádinky byly přenášeny do petriho misky s vodou. Pinzetou či jehlou bylo dokončeno očištění kořínků od zbytků zeminy. Takto zpracované kořínky byly připraveny pro pozorování morfotypů. Jelikož jsou zkoumané struktury relativně křehké, v celém procesu od sběru po určování je nutné postupovat se zvýšenou opatrností a zabránit poškození ECM špiček (Kjøller *et al.*, 2007).

2.4 Hodnocení morfologických znaků

Čisté kořínky byly postupně přeneseny do petriho misky z části naplněné vodou, aby pozorované ECM špičky byly vždy pod vodní hladinou. Na veškerou práci byla použita binokulární lupa Olympus SZX7. U jednotlivých kořínků byla zaznamenána délka a přítomné morfotypy ECM hub. Determinační znaky jednotlivých morfotypů byly pozorovány od nejmenšího po největší možné zvětšení binolupy (Kjøller *et al.*, 2007). Na každém druhu morfotypu lze rozlišit tyto základní znaky: délka, průměr, typ větvení, povrch a barva pláště, počet ECM špiček na 10 mm, stupeň a index větvení, přítomnost emanačních hyf a jejich umístění na ECM špičce, výskyt a frekvenci rhizomorf, příslušný explorační typ a přítomnost dalších specifických struktur jako jsou cystidia, sklerocia a laktifery (Agerer & Rambold 2004 – 2013). Na základě těchto poznatků byl určen rod a případně druh. Klíčovým předpokladem bylo nalezení daného morfotypu v níže uvedených klíčích, atlasů a databázi sloužící k determinaci ECM hub (Agerer 1987 – 2008). Hlavními publikacemi jsou především atlasy a popisné práce od německého autora Agerera. Internetové databáze ECM hub jsou uvedeny pod seznamem literatury.

Determinační klíče a atlasy ECM hub

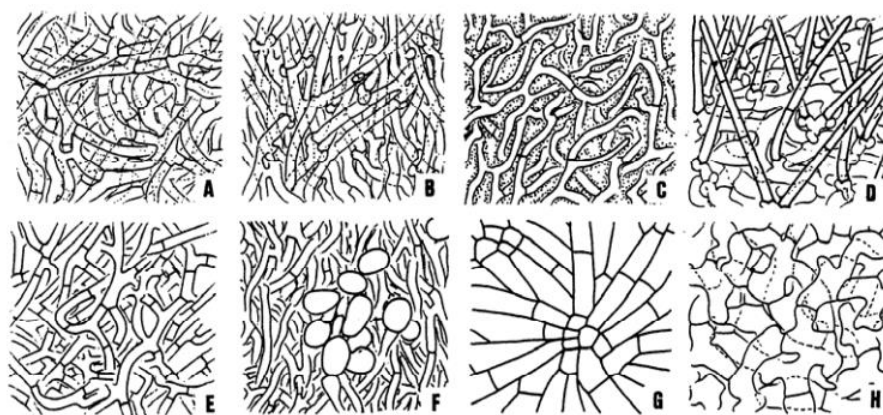
- Colour Atlas of Ectomycorrhizae (Agerer 1987 – 2008)
- Characterization of Ectomycorrhiza (Agerer (1991)
- Descriptions of Ectomycorrhizae (Agerer *et al.*, 1996 – 2006)
- Identification of ectomycorrhizas Ingleby *et al.*, (1990)
- A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961 (de Roman *et al.*, 2005)
- A manual of Concise Descriptions of North American Ectomycorrhizae including microscopic and molecular characterization (Goodman *et al.*, 1996)
- Ektomycorrhizen an *Fagus sylvatica*. Charakterisierung und Identifizierung, ökologische Kennzeichnung und unsterile Kultivierung Brand (1991)

Protože všechny zde uvedené zdroje zdaleka neobsahují popis všech možných ECM morfotypů na bucích, byly použity také vědecké články zabývající se determinací a rozlišením některých konkrétních druhů ECM hub (Buée *et al.*, 2005; Jakucs *et al.*, 2005; Jakucs *et al.*, 2008). Seznam nalezených morfotypů s determinačními znaky je uveden v příloze 1 Tab. 3. V rámci práce byl také každý morfotyp fotograficky zdokumentován pomocí digitálního fotoaparátu Olympus C-5060 a softwaru pro snímání fotek z mikroskopu QuickPhotoCamera 2.1. Obrázková galerie se snímky všech morfotypů se nachází v příloze 3.

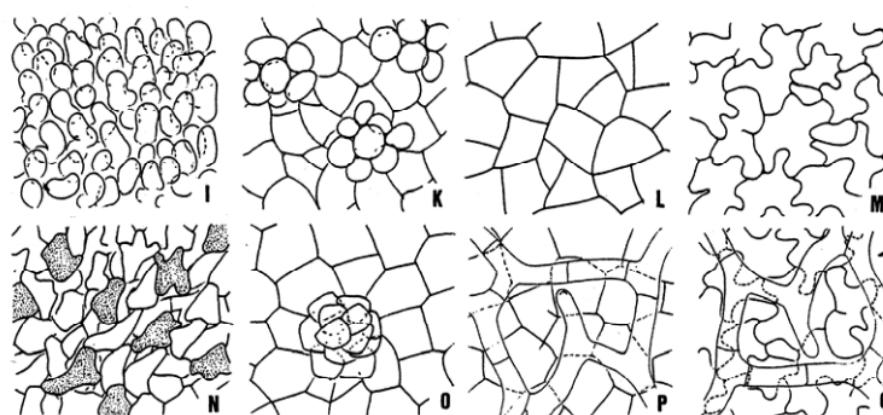
2.5 Anatomické znaky

Reprezentativní morfotypy byly dále podrobeny zkoumání pod mikroskopem Olympus BX41. V rámci práce byly připravovány dva základní typy mikroskopických preparátů, na kterých byly hodnoceny anatomické znaky ECM hub. Prvním typem byly preparáty, vytvořené z buněk pláště ECM špičky. ECM špička byla umístěna na podložní sklíčko. Pomocí pinzety byly odstraněny veškeré struktury emanačních hyf a rhizomorf. Takovéto objekty je možné mikroskopovat zvlášť. Pro odejmutí hyfového pláště bylo nutné použít preparační jehlu nebo pinzetu s ostrými konci. Takto získané vrstvy buněk pláště byly mikroskopovány z lícni i rubové strany. Rozlišujícím znakem jsou zpravidla tvary buněk. Pozorování bylo obvykle prováděno za zvětšení 200krát až 1000krát (Kjøller *et al.*, 2007).

Struktura pláště je jeden z klíčových anatomických znaků při určování ECM hub. Na nejsvrchnější části houbového pláště je možno rozpoznat dvě základní struktury uspořádání buněk. U prvního typu jsou buňky uspořádány po plektenchymatických pletiv se zachovalým lineárním charakterem hyf (Obr. 9). U druhého typu buňky vytvářejí pseudoparenchymatické pletivo bez viditelného lineárního charakteru hyf (Obr. 10). U tohoto typu je někdy možno pozorovat plektenchymatické uspořádání buněk na vnitřních vrstvách (Agerer 1991).



Obr. 9: Plektenchymatické uspořádání buněk pláště (Agerer 1991)

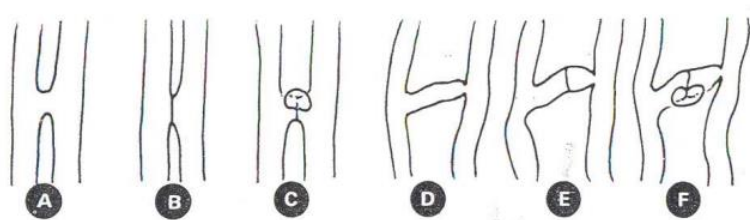


Obr. 10: Pseudoparenchamatické uspořádání buněk pláště (Agerer 1991)

Druhým typem mikroskopických preparátů byly příčné řezy ECM špičkami. Reprezentativní morfortyp byl umístěn pod binolupou do prořízlé bezové duše, ta byla následně krájena žiletkou na velice tenké řezy. Vybrané řezy byly přeneseny na krycí sklíčko. Mikroskopování bylo prováděno v plném rozsahu zvětšení. Cílem pozorování bylo rozlišit tvar buněk, Hartigovu síť, emanační hyfy a jejich struktury, cystidia a další charakteristické struktury. (Kjøller *et al.*, 2007).

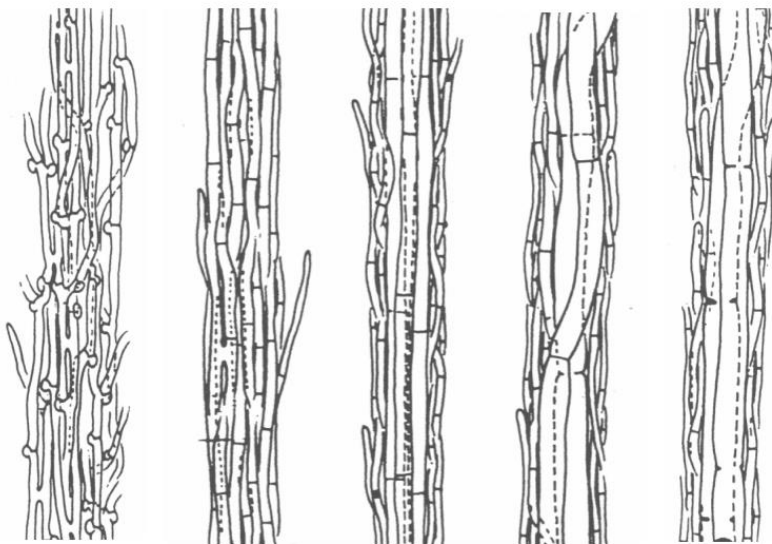
Emanační hyfy a jejich struktury jsou významným určujícím znakem ECM hub. Některé rody jsou charakteristické mohutným rozvojem emanačních hyf, jiné zase vytváří jen velice málo těchto hyf. V takových případech většinou nejsou emanační hyfy ani pozorovatelné a houbový plášť se jeví jako hladký. V některých případech emanační hyfy vytvářejí specifické struktury tvaru bradaviček nebo krystalků. Emanční hyfy jsou též variabilní v tloušťce a barvě. Nejčastější typy jsou bezbarvé nebo černé. Významným znakem zařazující druhy hub do oddělení Basidiomycota je přítomnost přezek na hyfách. Nicméně existují i okrajové rody oddělení Basidiomycota, které přezky nemají nebo jsou přezky přítomny jen velmi zřídka. Naopak charakteristickým znakem hub z oddělení

Ascomycota je přítomnost Woroninových tělísek ve středech sept. Dalším významným znakem je vzhled struktur spojující jednotlivé emanační hyfy. Takovéto srůsty hyf se nazývají anastomózy a jsou pro jednotlivé rody charakteristické (Agerer 1991). Příklady některých z nich jsou vidět na Obr 11.



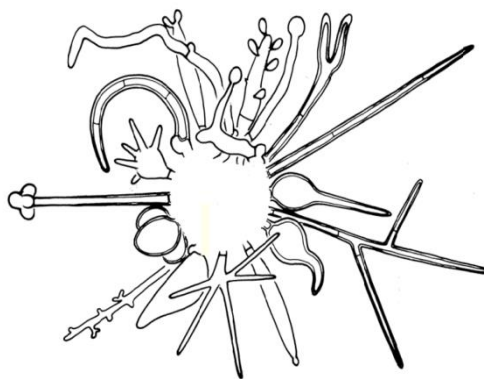
Obr. 11: Různé typy anastomóz (Agerer 1991)

Mnoho ECM hub vytváří specifické struktury hyf nazývané rhizomorfy. Jedná se lineární shluk hyf sloužící k rozšiřování houby a transportu živin na delší vzdálenosti. I v tomto případě anatomická stavba rhizomorf není druhově jednotná. Některé druhy vytvářejí pouze shlukové lineární hyfy, jiné druhy naopak diverzifikované středové hyfy, které jsou obklopeny normálně vypadajícími emanačními hyfami. Jednotlivé typy rhizomorf podle pokročilosti zleva doprava ilustruje Obr. 12 (Agerer 1991; Agerer 2006).



Obr. 12: Typy rhizomorf (Agerer 1991)

Další specifické struktury na anatomických řezech jsou cystidie. Jedná se obvykle o vícebuněčné struktury diferencující se z buněk na povrchu pláště. Jejich přítomnost a tvar je pro určení některých druhů ECM klíčovým znakem. Různé typy cystidií jsou zobrazeny na Obr. 13 (Agerer 2006).



Obr. 13: různé typy cystidií (Agerer 1991)

Každý příčný řez byl fotograficky zdokumentován pomocí digitálního fotoaparátu Olympus C-5060 a softwaru pro snímání fotek z mikroskopu QuickPhotoCamera 2.1. Obrázková galerie příčných řezů všech nalezených morfotypů se nachází příloze 3.

2.6 Molekulární analýza

2.6.1 Příprava ECM špiček pro molekulární analýzu

Vybrané reprezentativní morfotypy byly za použití skalpelu odříznuty a opláchnuty v destilované vodě. Následně byly přeneseny do mikroskopavek a fixovány roztokem 70 % ethanolu. Alternativní možností by bylo ECM špičky hluboce zamrazit bez použití fixačního roztoku (Suz *et al.*, 2008). Pokud je plánováno izolovat DNA pomocí metody CTAB, je možné jako fixační roztok použít přímo extrakční buffer CTAB (Kjøller *et al.*, 2007). Do izolace DNA byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě.

2.6.2 Izolace DNA z morfotypů

Z vybraných reprezentativních morfotypů je prováděna izolace DNA zpravidla dvěma způsoby. Prvním způsobem je užití CTAB chloroform-isopropanolové extrakční metody (Rogers & Bendich 1985; Doyle & Doyle 1990; Henrion *et al.*, 1992). Tato metoda je levnější, ale časově náročnější. Druhou možností je užití některého z komerčních izolačních

kitů. Izolace všech reprezentativních morfotypů byla provedena pomocí izolačního kitu DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Postup izolace pomocí kitu QIAGEN je popsán v příloze 2 – protokol QIAGEN. Proces izolace byl sice finančně náročnější, ale naopak daleko rychlejší, než kdyby byla použita metoda CTAB.

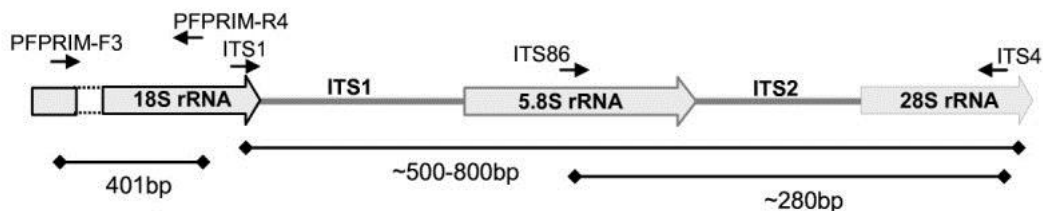
2.6.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR, je standardní metodou k získání velkého množství kratších úseků vyizolované DNA. V rámci práce byl použit standardní typ PCR reakce přizpůsoben pro druhy ECM hub Bent *et al.*, (2011). Složení PCR směsi i jednotlivé kroky zaznamenány v příloze 2 – protokol PCR. V rámci studia ECM hub se používají i další alternativní typy PCR reakcí:

- PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) – využívána při populačních studiích ECM hub (Suz *et al.*, 2008)
- Terminal-RFLP – standardní metodou při charakterizaci společenstev ECM hub (Burke *et al.*, 2005)
- Real-Time PCR – Quantitative PCR – metoda používaná pro kvantifikaci jednotlivých druhů ECM hub ve vzorcích (Anderson *et al.*, 2007)

Výběr primerů pro identifikaci ECM hub

Pro identifikaci ECM hub je standardně využívána amplifikace úseku rDNA v ITS oblasti (Obr. 14).



Obr. 14: ITS oblast používaná i identifikaci ECM hub

K tomuto účelu se používají primerové dvojice ITS oblasti. Nejčastější páry jsou ITS1 – ITS4, ITS1F – ITS4 a ITS1F – ITS4B.

- ITS1 – ITS4:

Tento primerový pár je používám především při izolaci u materiálu získaného z plodnic, hub pěstovaných v kultuře nebo u ECM hub na kořenech jehličnanů. Výhodou toho páru je velice špatná amplifikace s DNA nahosemenných rostlin, proto se výborně hodí pro identifikaci ECM hub na jehličnanech (Kjøller *et al.*, 2007). Amplifikovaný úsek je dlouhý přibližně 600 bp (párů bází) a je znám téměř u všech ECM hub (White *et al.*, 1990).

- ITS1F – ITS4:

V tomto primerovém páru je místo ITS1 použit specifický primer hub ITS1F. Tato dvojice primerů je standardem ve většině prací zaměřených na společenstva ECM hub. Ne vždy však poskytuje optimální výsledky a záleží na odladění PCR reakce pro konkrétní druhy hub (Dickie *et al.*, 2002).

- ITS1/ITS1F – LR21:

Poslední dvojice primerů amplifikuje úsek DNA zasahující částečně i mimo ITS blast. Tato část je více konzervativní a není v současné době známa u širokého spektra ECM hub jako předchozí primerová dvojice (Kjøller *et al.*, 2007).

Z představených dvojic byla vybrána kombinace primerů ITS1F (Gardes & Bruns 1993) sekvence 5' -> 3' GCTGCGTTCTTCATCGATGC a ITS4 (White *et al.* 1990) sekvence 5' -> 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC. Tato primerová dvojice byla použita ve studiích ECM hub například Dickie *et al.*, (2002) a Genney *et al.*, (2006).

2.6.4 Sekvence DNA

PCR produkty byly separovány pomocí na 1% agarózovém gelu (2μl PCR produktu + 1μl GeLRed) v TBE pufru a vizualizovány pod UV světlem v transiluminátoru (TFX-35.M Vilber Lourmat). Pakliže se PCR produkty na gelu ukázaly jako dostatečné pro sekvenační reakci, byla připravena sekvenační reakce (7,5 μl) a vzorky sekvenovány v laboratoři genomiky na UMBR AVČR. Trojice vzorků, u nichž analýza PCR produktů a sekvenace

prokazovala přítomnost více druhů (půdní saprofytické mikromycety aj.), musely být klonovány.

Výsledné produkty sekvenace byly upraveny a přečteny v programu Genious R1 6.1.2. Na základě zjištěných pořadí bází byly v databázích GeneBank a BLAST na internetových stránkách <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> vyhledány příslušné taxony a porovnány s výsledky morfologických analýz morfotypů.

2.7 Statistické vyhodnocení a použité způsoby zobrazení

Pro vyhodnocení druhové bohatosti byly dle metodiky Suz *et al.*, (2008) ve vzorcích zaznamenány výskyty morfotypů ECM hub. Následně byla data přepsána do počítačového programu Microsoft Excel 2010, ve kterém byly vytvořeny tabulky. Po transformaci dat byly záznamy otevřeny v počítačovém programu StatSoft STATISTICA 10, ve kterém byly vytvořeny příslušné grafy.

Diverzita může být v rámci studií ECM hub charakterizována pozorovaným počtem druhů, Shanonovým indexem (H), Simsonovým indexem (λ), Pielouvo rovností (H'), Margalefovým indexem, Whittakerovým indexem β -diversity a permutačními metodami Log $\alpha(S)$ a Jackknife (Sue *et al.*, 2008). V rámci práce je druhová bohatost vyhodnocena jako pozorované počty druhů, výpočtem druhové bohatosti (d) a Shannovým indexem diverzity.

- Druhová bohatost (d): $d = (S-1) / \log N$, kde S = počet druhů a N = počet jedinců (Kraigher *et al.*, 2007)
- Shannonův index diverzity (H) $H = -\sum p_i \ln p_i$, kde p_i je relativní četnost morfotypu i ve vzorku (Barbour *et al.*, 1999)

Pro vyhodnocení četnosti ECM hub byly na očištěných kořincích počítány ektomykorhizy podle metodiky Suz *et al.*, (2008) použité například ve studii ECM hub Courty *et al.*, (2008). Při testování vlivu lokalit, půdních horizontů a sezón na četnost ektomykorhiz byl použit program Microsoft Excel 2010 pro zpracování dat a vytvoření tabulek. Pro statistické vyhodnocení ANOVA repeated measurement (Zar 1996) byl použit počítačový program StatSoft STATISTICA 10. Dále byl program STATISTICA použit pro vytvoření veškerých grafů a vynesení četností jednotlivých druhů i exploračních typů.

Pro zpracování a úpravu obrázků byly použity počítačové programy QuickPhotoCamera 2.1 a GIMP 2.8.

3 Výsledky

3.1 Nalezené druhy

Na základě morfologické a anatomické analýzy ECM mykorhiz bylo identifikováno 17 morfotypů. Z toho u 11 se podařilo určit do rodu nebo i druhu, zbylých 6 morfotypů bylo na základě morfotypování zařazeno do skupiny *Fagirhiza*.⁶ Molekulární analýza s následnou sekvenací PCR produktu potvrdila, že morfotypy skupiny *Fagirhiza* tvoří téměř výhradně rod *Tomentella sp.* To potvrzují i morfologicko – anatomické studie Jakucs *et al.*, (2008). Data v databázi NCBI Gen Bank se přibližují k možné identifikaci rodu 98 - 96%, ale pravděpodobnost druhové určení je nižší než 93%. Kombinací morfotypování a molekulární analýzy bylo 13 morfotypů určeno rodem i druhem, zbývající 4 morfotypy byly s jistotou zařazeny alespoň do rodu. Výsledky z molekulární analýzy jsou shrnuty v Tab. 2.

Na všech vybraných lokalitách za rok 2012 a 2013 bylo dohromady nalezeno 17 druhů ECM hub. Za první rok bylo identifikováno celkem 10 druhů a v druhém roce 16 druhů ECM hub. Konkrétní počty druhů na jednotlivých lokalitách v jednotlivých letech ukazuje Tab. 1. Výskyt druhů hub v konkrétních lokalitách za rok 2012 a 2013 ukazuje Tab. 3.

Tab. 1: Počty nalezených druhů ECM hub na lokalitách Švelhán, Kluk a Vysoká Běta v roce 2012, 2013 a v obou letech zároveň

Lokalita	2012	2013	celkem
Švelhán	5	11	11
Kluk	7	6	11
Vysoká Běta	7	11	14

⁶ Uměle vytvořená skupina morfotypů vyskytující se na buku, u nichž není jasné, ke kterému konkrétnímu druhu ECM houby patří. Podobně existují například *Piceirhiza* u morfotypů spjatých se smrkem apod.

Tab. 2: Seznam nalezených druhů z molekulární analýzy; procenta udávají shodu s databází GenBank, bp = párů bází, *Lactarius blennius*, *Lactarius subdulcis* a *Russula mairei* museli být klonovány (identifikace druhého druhu uvedena ve sloupci vedlejší druh). U morfotypu *Fagrhiza arachnoidea* nebylo přítomno dostatečné množství DNA pro analýzu, druh byl určen jen na základě morfologických a anatomických znaků

Druh	Query [%]	Max. likelihood [%]	bp	Vedlejší druh	bp
<i>Boletus erythropus</i>	100	100	625		
<i>Byssocorticium atrovirens</i>	93	99	566		
<i>Cenococcum geophilum</i>	99	97	823		
<i>Fagrhiza arachnoidea</i>					
<i>Laccaria amethystea</i>	100	97	672		
<i>Lactarius blennius</i>	100	99	596	<i>Mortierella alpina</i>	676
<i>Lactarius subdulcis</i>	100	100	496	<i>Scleroderma citrinum</i>	421
<i>Otidea onotica</i>	100	99	685		
<i>Russula mairei</i>	100	100	568	<i>Mucor circinelloides</i>	723
<i>Russula nigricans</i>	100	99	933		
<i>Tomentella cf. lilacinogrisea</i>	100	96	619		
<i>Tomentella ferruginea</i>	98	99	568		
<i>Tomentella sp.</i>	96	92	582		
<i>Tomentella cf. sublilacina</i>	93	98	548		
<i>Tomentella sublilacina</i>	100	96	619		
<i>Tuber annae</i>	100	99	682		
<i>Xerocomus pruinatus</i>	100	99	628		

Tab. 3: Výskyt nalezených druhů hub na lokalitách Švelhán, Kluk a Vysoká Běta v roce 2012 a 2013

Druh	Švelhán		Kluk		Vysoká Běta	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
<i>Boletus erythropus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Byssocorticium atrovirens</i>	-	-	-	+	-	+
<i>Cenococcum geophilum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Fagrhiza arachnoidea</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Laccaria amethystea</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Lactarius blennius</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Lactarius subdulcis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Otidea onotica</i>	-	+	+	-	-	+
<i>Russula mairei</i>	-	+	+	-	+	+
<i>Russula nigricans</i>	+	+	-	-	+	-
<i>Tomentella cf. lilacinogrisea</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Tomentella ferruginea</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Tomentella sp.</i>	-	+	-	+	-	-
<i>Tomentella cf. sublilacina</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Tomentella sublilacina</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Tuber annae</i>	-	-	-	+	-	+
<i>Xerocomus pruinatus</i>	-	-	-	+	-	-

Ze 17 identifikovaných druhů patřili tři zástupci do oddělení Ascomycota a zbývajících 14 druhů do oddělení Basidiomycota. Taxonomické postavení jednotlivých druhů a přiřazení druhů do exploračních typů zobrazuje Tab 4.

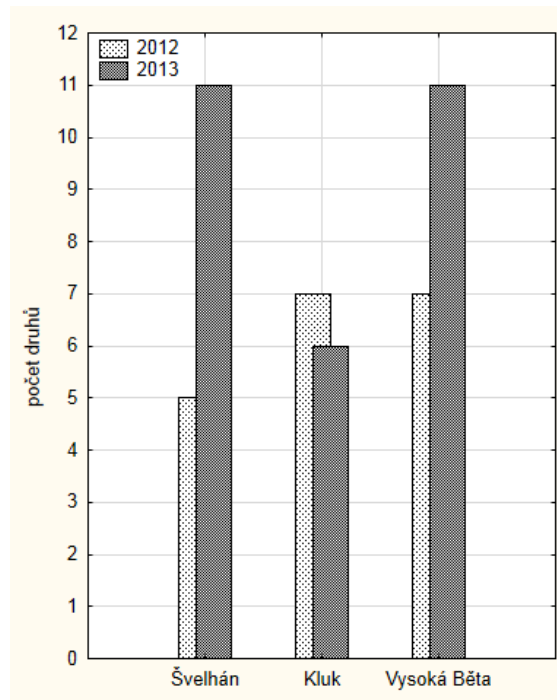
Tab. 4: Zařazení identifikovaných druhů do exploračního typu, oddělení, třídy a čeledi

Druh	explorační typ	oddělení	třída	čeleď
<i>Boletus erythropus</i>	long distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletaceae
<i>Byssocorticium atrovirens</i>	short distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Atheliaceae
<i>Cenococcum geophilum</i>	short distance	Ascomycota	Dothideomycetes	
<i>Fagirhiza arachnoidea</i>	contact	Basidiomycota		
<i>Laccaria amethystea</i>	medium distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Tricholomataceae
<i>Lactarius blennius</i>	medium distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulaceae
<i>Lactarius subdulcis</i>	medium distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulaceae
<i>Otidea onotica</i>	long distance	Ascomycota	Mycelia sterila	Pyronemataceae
<i>Russula mairei</i>	medium distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulaceae
<i>Russula nigricans</i>	medium distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulaceae
<i>Tomentella cf. lilacinogrisea</i>	contact	Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephoraceae
<i>Tomentella ferruginea</i>	contact	Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephoraceae
<i>Tomentella sp.</i>	contact	Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephoraceae
<i>Tomentella cf. sublilacina</i>	contact	Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephoraceae
<i>Tomentella sublilacina</i>	contact	Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephoraceae
<i>Tuber annae</i>	short distance	Ascomycota	Pezizomycetes	Tuberaceae
<i>Xerocomus pruinatus</i>	long distance	Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletaceae

Z grafu na Obr. 15 je patrná výrazná meziroční změna v počtu nalezených druhů ECM hub. Na lokalitách Švelhán a Vysoká Běta došlo k podstatnému nárůstu počtu identifikovaných druhů mezi roky 2012 a 2013. V případně lokality Švelhán je počet druhů v druhém roce více než dvojnásobný (nárůst nalezených druhů o více než 55 %). Podobný meziroční nárůst lze pozorovat i na lokalitě Vysoká Běta, kde rozdíl v počtu druhů mezi roky 2012 a 2013 představoval necelých 37 %. Pokud se podíváme na lokalitu Kluk, není zde patrná výrazná meziroční změna v počtech druhů.

Pokud bychom porovnávali jednotlivé lokality bez ohledu na rok sběru, došli bychom k závěru, že výsledné počty druhů jsou relativně stejné (Tab. 1). V případě lokalit Švelhán a Kluk bylo nalezeno 11 druhů a nejvíce 14 druhů bylo identifikováno na lokalitě Vysoká Běta.

Při porovnání roků bez ohledu na lokality je možno zjistit, že rok 2012 byl na počty druhů relativně chudší. V roce 2012 bylo identifikováno 10 druhů hub a v následujícím roce 16 druhů. Celkový meziroční nárůst v počtu identifikovaných druhů je přibližně 60 %.



Obr. 15: Graf počtu identifikovaných druhů ECM hub na jednotlivých lokalitách v letech 2012 a 2013

3.2 Druhová bohatost a Shannonův index

Vypočtené druhové bohatosti (d) a Shannonovy indexy (H) na jednotlivých lokalitách v letech 2012 a 2013 a v obou letech dohromady ukazují Tab. 5 a Tab. 6. Z uvedených hodnot je patrné, že druhová bohatost byla na všech lokalitách výrazně větší v druhém roce. Pokud porovnáme jednotlivé lokality, nejmenší druhová bohatost se nacházela na lokalitě Švelhán, naopak největší druhová bohatost byla na lokalitě Vysoká Běta.

Při pohledu na Shannonovy indexy v Tab. 6 vidíme relativně nízké hodnoty ve všech lokalitách. Pokud bychom porovnávali meziroční rozdíl v jednotlivých lokalitách, největší rozdíl nalezneme na lokalitě Vysoká Běta. Naopak celkově největší hodnota Shannonova indexu byla získána z dat lokality Kluk.

Tab. 5: Druhá bohatost (d) na jednotlivých lokalitách v letech 2012 a 2013 a v obou letech dohromady

Druhá bohatost	2012	2013	celkem
Švelhán	1,80	3,99	3,73
Kluk	2,48	2,81	4,04
Vysoká Běta	2,92	4,50	5,01

Tab. 6: Vypočtené Shanonnovy indexy (H) na jednotlivých lokalitách v letech 2012 a 2013 a v obou letech dohromady

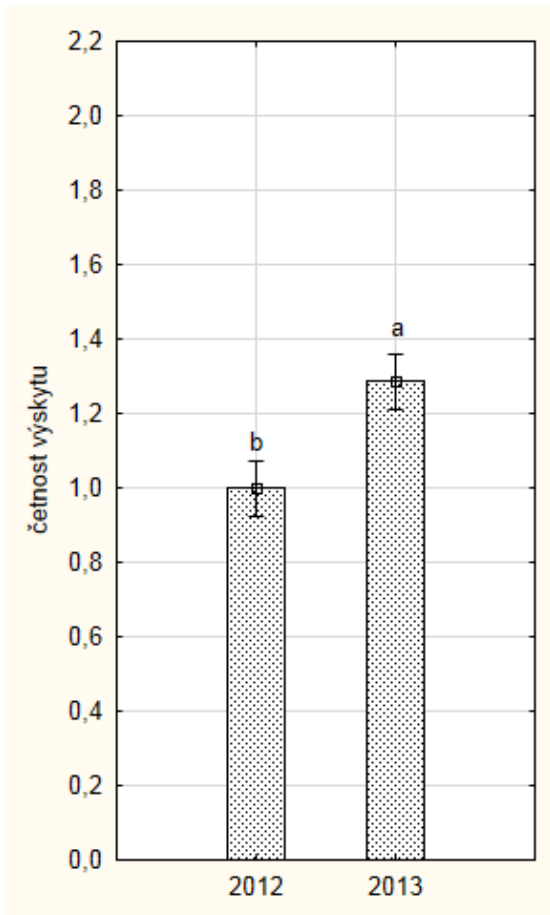
Shanonnův index	2012	2013	celkem
Švelhán	1,48	1,64	1,70
Kluk	1,52	1,49	2,35
Vysoká Běta	1,41	1,81	2,16

3.3 Četnost výskytu v závislosti na půdním horizontu, lokalitě a roce

Vliv roku sběru na celkovou četnost všech EMC druhů na všech sledovaných lokalitách byl hodnocen pomocí statistické analýzy ANOVA repeated measurement v programu StatSoft STATISTICA. Data splňovala podmínku normality dat a nebyla nijak transformována. Výsledek z testované nulové hypotézy o nerozdílnosti roků vyšel neprůkazně ($p \leq 0,05$), můžeme proto tvrdit, že rok sběru ovlivňoval četnost výskytu ECM hub. Vizualně nám tento výsledek zobrazuje graf na Obr. 16.

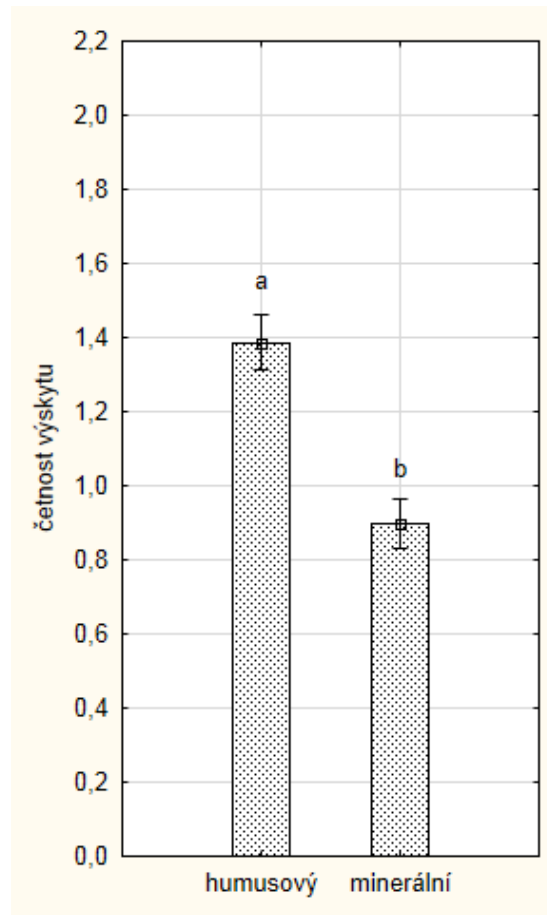
Celková četnost druhů v závislosti na humusovém a minerálním půdním horizontu byla vyhodnocena pomocí statistické analýzy ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$). Data splňovala podmínku normality dat a nebyla nijak transformována. Výsledek z testované nulové hypotézy o nerozdílnosti půdních horizontů se ukázal jako neprůkazný ($p \leq 0,05$), z těchto výsledků můžeme usuzovat, že půdní horizont má vliv na četnost výskytu ECM hub, viz graf na Obr. 17.

Podobné statistické vyhodnocení bylo provedeno i v případě vlivu lokality na četnost ECM hub. Zde byla nulová hypotéza o shodnosti lokalit také vyvrácena ($p \leq 0,05$). Grafické znázornění vlivu četnosti ukazuje graf na Obr. 18. Následný Tukey test však prokázal odlišnost pouze v případě lokality Švelhán a lokality Kluk ($p \leq 0,05$). Lokality Kluk a Vysoká Běta se statisticky nelišily ($p > 0,05$). Rozdíl nebyl prokázán ani v případě lokalit Švelhán a Vysoká Běta ($p > 0,05$). Konkrétní hodnoty Tukey testu lze nalézt v Tab. 7.



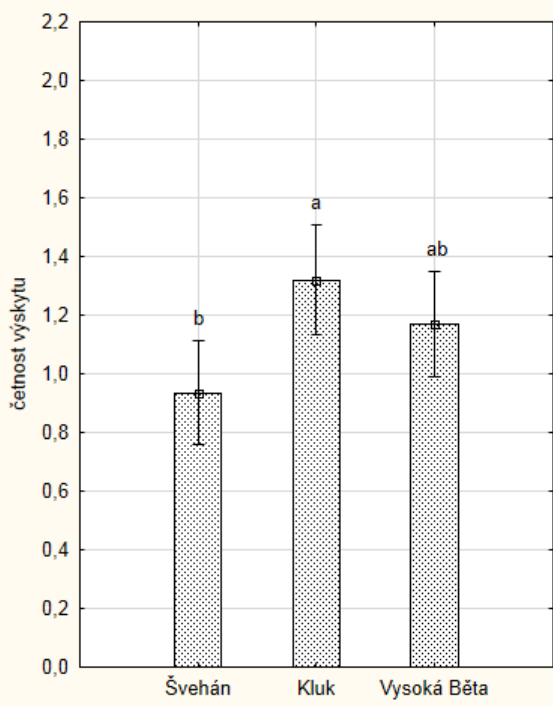
Obr. 16: Graf závislosti četnosti výskytu ECM hub (ve všech lokalitách a horizontech) na roce sběru, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$), $F_{1, 47} = 7,6745$; $p = 0,008$; zobrazeno průměr±SE, indexy a,b označují statisticky průkazný rozdíl mezi roky

rok 2012 (průměr±SE): 1,010±0,0739
 rok 2013 (průměr±SE): 1,286±0,0731



Obr. 17: Graf závislosti četnosti výskytu ECM hub (ve všech lokalitách a letech) na typu půdního horizontu, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$), $F_{1, 47} = 25,655$; $p = 0,00001$; zobrazeno průměr±SE, indexy a,b označují statisticky průkazný rozdíl mezi roky

humusový horizont (průměr±SE):
 1,386±0,0755
 minerální horizont (průměr±SE):
 0,898±0,8981



Obr. 18: Graf závislosti četnosti výskytu (v obou půdních horizontech a letech) na konkrétní lokalitě, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$), $F_{2, 47} = 4,6073$; $p = 0,01489$; průměr±SE, Indexy a, b, c označují statisticky průkazný rozdíl mezi roky

Švehán (průměr±SE): 0,936±0,0888
 Kluk (průměr±SE): 1,321±0,0923
 Vysoká Běta (průměr±SE): 1,170±0,0888

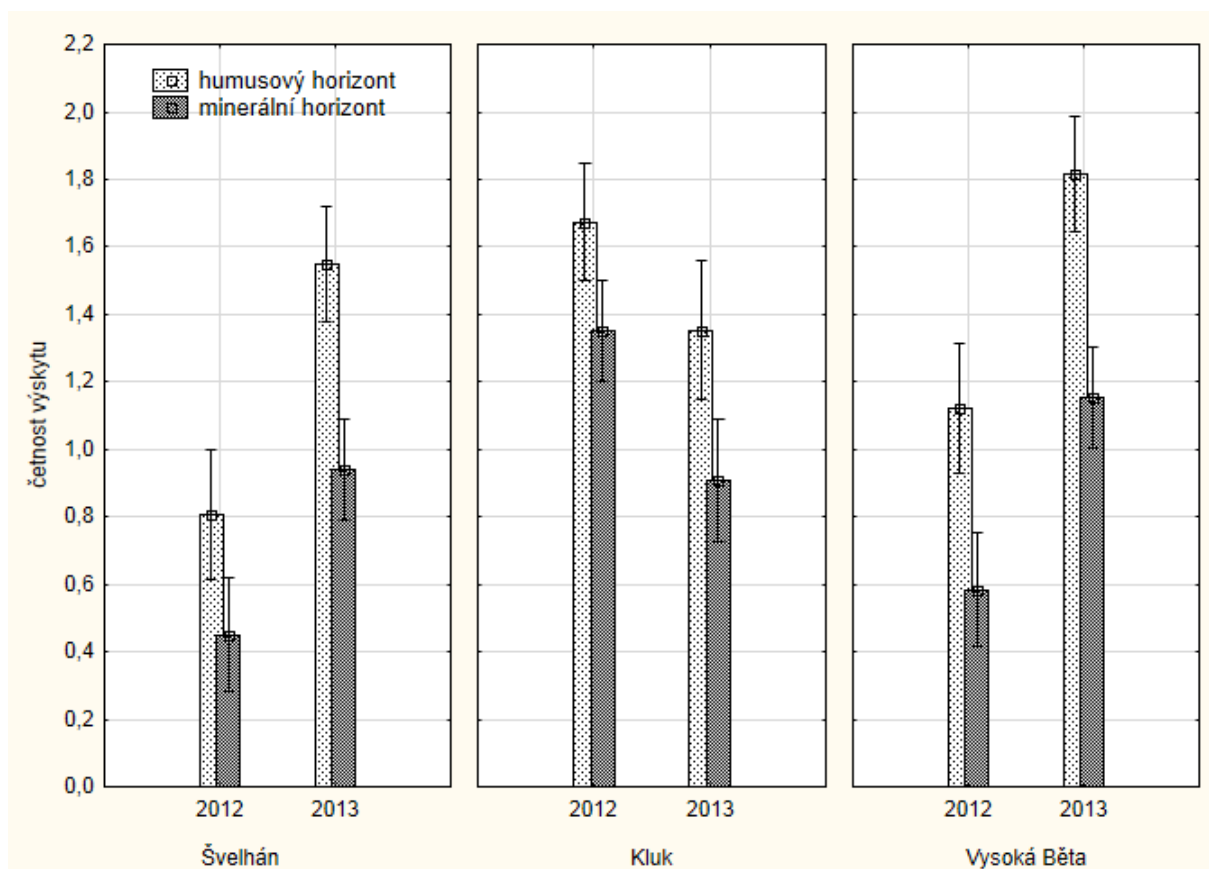
Tab. 7: Výsledky Tukey testu pro ANOVA repeated measurement, faktor lokalita, viz Obr. 18

kombinace lokalit	pravděpodobnost
Švelhán*Kluk	$p = 0,010861^*$
Švelhán*Vysoká Běta	$p = 0,156516$
Kluk*Vysoká Běta	$p = 0,469019$

Tab. 8: Vliv faktoru lokality, roku a půdního horizontu a jejich kombinací na četnost výskytu ECM hub, ANOVA repeated measurement, $\alpha < 0,05$

faktor	výsledek
lokalita	$F_{2, 47} = 4,6073$; $p = 0,01489^*$
rok	$F_{1, 47} = 7,6745$; $p = 0,008^*$
horizont	$F_{1, 47} = 25,655$; $p = 0,00001^*$
lokalita*rok	$F_{2, 47} = 10,150$; $p = 0,00022^*$
lokalita*horizont	$F_{2, 47} = 0,41789$; $p = 0,66086$
rok*horizont	$F_{1, 47} = 0,74583$; $p = 0,39219$
lokalita*rok*horizont	$F_{1, 47} = 0,74583$; $p = 0,39219$

Shrnutí veškerých výsledků ze statistické analýzy ANOVA repeated measurement lze vyhledat v Tab. 8. Pouze kombinace faktorů lokalita a rok vyšla statisticky průkazně, ostatní kombinace faktorů nikoli. Graf na Obr. 19 zobrazuje vynesení všech tří faktorů dohromady (ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$) s neprůkazným rozdílem ($p > 0,05$)). Na všech lokalitách je možno pozorovat větší četnosti ECM hub v humusových horizontech. Z grafu je také vidět daleko větší podobnost lokalit Švelhán a Vysoká Běta, u kterých je možno vysledovat i významný nárůst četnosti ECM hub v roce 2013. U lokality Kluk je naopak vidět meziroční pokles.



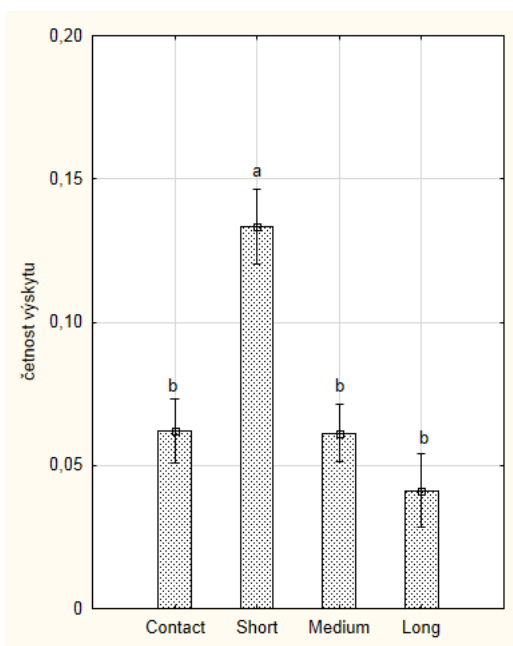
Obr. 19: Graf zobrazuje kombinaci faktorů lokalita*rok*horizont na celkovou četnost ECM hub, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$), $F_{2,47} = 0,05051$; $p = 0,95080$, průměr \pm SE

3.4 Explorační typy

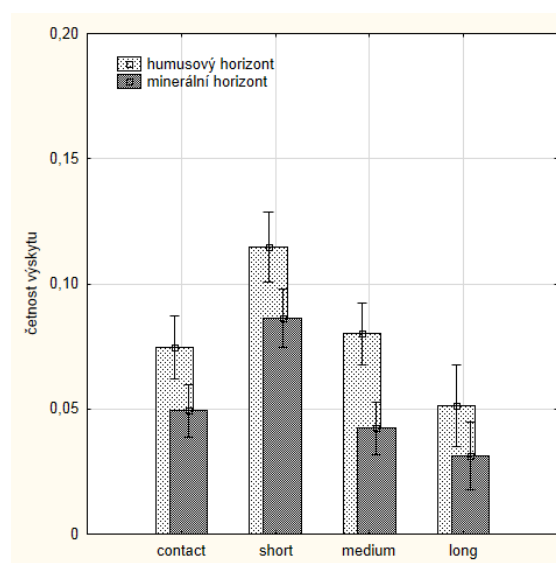
Dále byly v rámci práce hodnoceny ECM houby rozdělené podle exploračních typů. Tyto funkční ekologické skupiny sdružují druhy ECM hub podle jejich strategie rozšiřování a získávání živin (1.4 Explorační typy na str. 4). Pro zjištění, zda existuje rozdíl mezi četnostmi ECM hub v jednotlivých exploračních typech, byla opět použita statistická analýza ANOVA repeated measurement. Data splňovala podmínku normality dat a nebyla nijak transformována. Výsledek z testované nulové hypotézy o nerozdílnosti se ukázal jako neprůkazný ($p \leq 0,05$), je tedy možno říci, že četnosti ECM hub se v jednotlivých exploračních typech lišily. Výsledky je možno vidět na Obr. 20. Po provedení Tukey testu byl průkazný rozdíl nalezen pouze u exploračního typu s krátkými hyfami vůči ostatním exploračním skupinám, viz Tab. 9. Na Obr. 21 je graf závislosti četnosti na exploračních typech v jednotlivých půdních horizontech. Z grafu můžeme vidět, že žádná explorační skupina nepreferovala konkrétní půdní horizont ($p > 0,05$) ani lokalitu ($p > 0,05$).

Tab. 9: Výsledky Tukey testu pro ANOVA repeated measurement $F_{3, 771} = 10,071$; $p < 10^{-5}$, porovnání četnosti v jednotlivých exploračních typech, viz Obr. 21, contact = kontaktní explorační typ, short = explorační typ s krátkými hyfami, medium = explorační typ se středně dlouhými hyfami, long = explorační typ s dlouhými rhizomorfami

kombinace exp. typů	pravděpodobnost
contact*short	$p = 0,00011^*$
contact*medium	$p = 0,99911$
contact*long	$p = 0,39574$
short*medium	$p = 0,00003^*$
short*long	$p = 0,00001^*$
medium*long	$p = 0,42685$

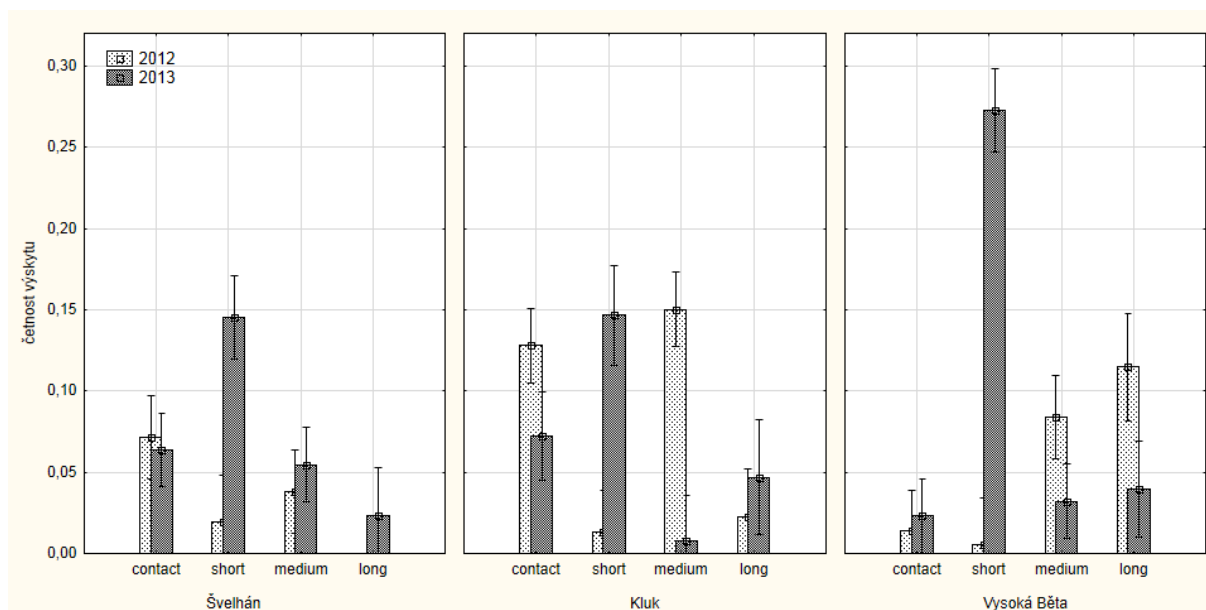


Obr. 20: Graf četnosti ECM hub v jednotlivých exploračních typech, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement $F_{3, 771} = 10,071$; $p < 10^{-5}$, průměr±SE. Indexové hodnoty a, b ukazují na statisticky průkazný rozdíl mezi exploračními typy (Tukey test Tab. 9), průměr±SE, contact = kontaktní explorační typ, short = explorační typ s krátkými hyfami, medium = explorační typ se středně dlouhými hyfami, long = explorační typ s dlouhými rhizomorfami



Obr. 21: Graf četnosti ECM hub v jednotlivých exploračních typech v závislosti na půdních horizontech, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement $F_{3, 877} = 0,35201$; $p = 0,78771$, průměr±SE, contact = kontaktní explorační typ, short = explorační typ s krátkými hyfami, medium = explorační typ se středně dlouhými hyfami, long = explorační typ s dlouhými rhizomorfami

Při porovnání četnosti výskytu exploračních typů v závislosti na kombinaci faktorů rok a lokalita je patrná velká různorodost v dominanci jednotlivých exploračních typů. Četnosti se výrazně liší mezi roky i lokalitami. Grafické znázornění kombinace faktoru lokality a roku sběru nalezneme na Obr. 22. Velice zajímavá je například četnost exploračního typu se středně dlouhými hyfami na lokalitě Kluk a Vysoká Běta, která se během jednoho roku naprosto obrátila. Naopak relativně stabilnější bez významných změn se jeví explorační skupiny s krátkými a dlouhými hyfami.

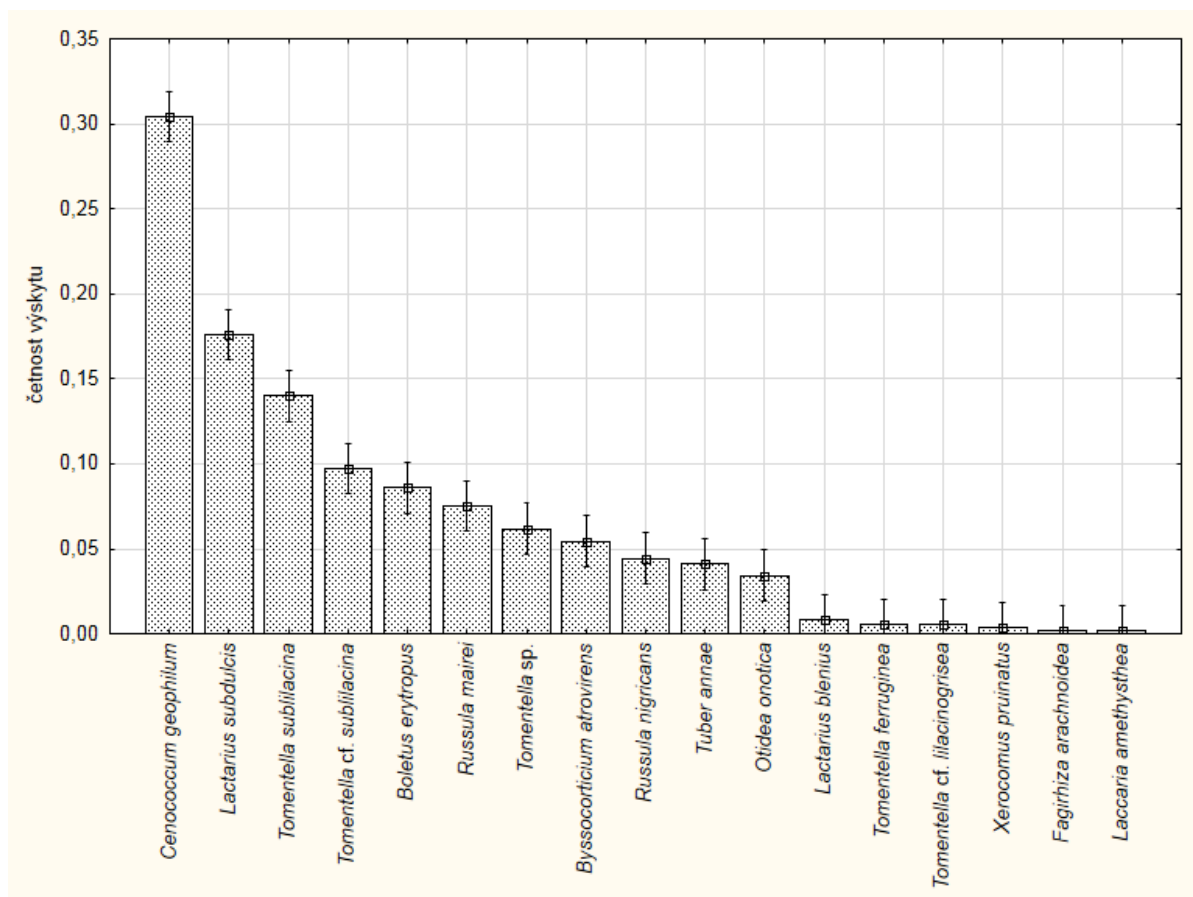


Obr. 22: Graf zobrazující kombinaci lokality a roku na četnost exploračních typů, vyhodnoceno ANOVA repeated measurement $F_{6, 771} = 3,8971$; $p = 0,00077$; průměr \pm SE; contact = kontaktní explorační typ, short = explorační typ s krátkými hyfami, medium = explorační typ se středně dlouhými hyfami, long = explorační typ s dlouhými rhizomorfy

3.5 Četnost jednotlivých druhů

Součet výskytů ECM hub na všech lokalitách za dva roky jednoznačně ukazuje výraznou dominanci druhu *Cenococcum geophilum*, převyšující svou četností všechny ostatní nalezené druhy hub. V pořadí druhý *Lactarius subdulcis* a třetí druh *Tomentella sublilacina*, tvoří skupinu s relativně vysokou četností výskytu, nicméně v porovnání s dominantním druhem *Cenococcum geophilum* je jejich četnost poloviční. Druhy *Tomentella cf. sublilacina*, *Boletus erythropus*, *Russula mairei*, *Tomentella sp.*, *Byssocorticium atrovirens*, *Russula nigricans*, *Tuber annae*, *Otidea onotica* představují druhy ECM hub, které celkově nevyvíkaly významnou četností, ale tvoří skupinu relativně běžně se vyskytujících druhů.

Naopak druhy *Lactarius blennius*, *Tomentella ferruginea*, *Tomentella cf. lilacinogrisea*, *Xerocomus pruinatus*, *Fagirhiza arachnoidea* a *Laccaria amethystea* se vyskytovaly s opravdu minimální četností, obvykle jen v jednom či dvou odebraných vzorcích. Celkové četnosti jednotlivých druhů jsou vyneseny v grafu na Obr. 23.



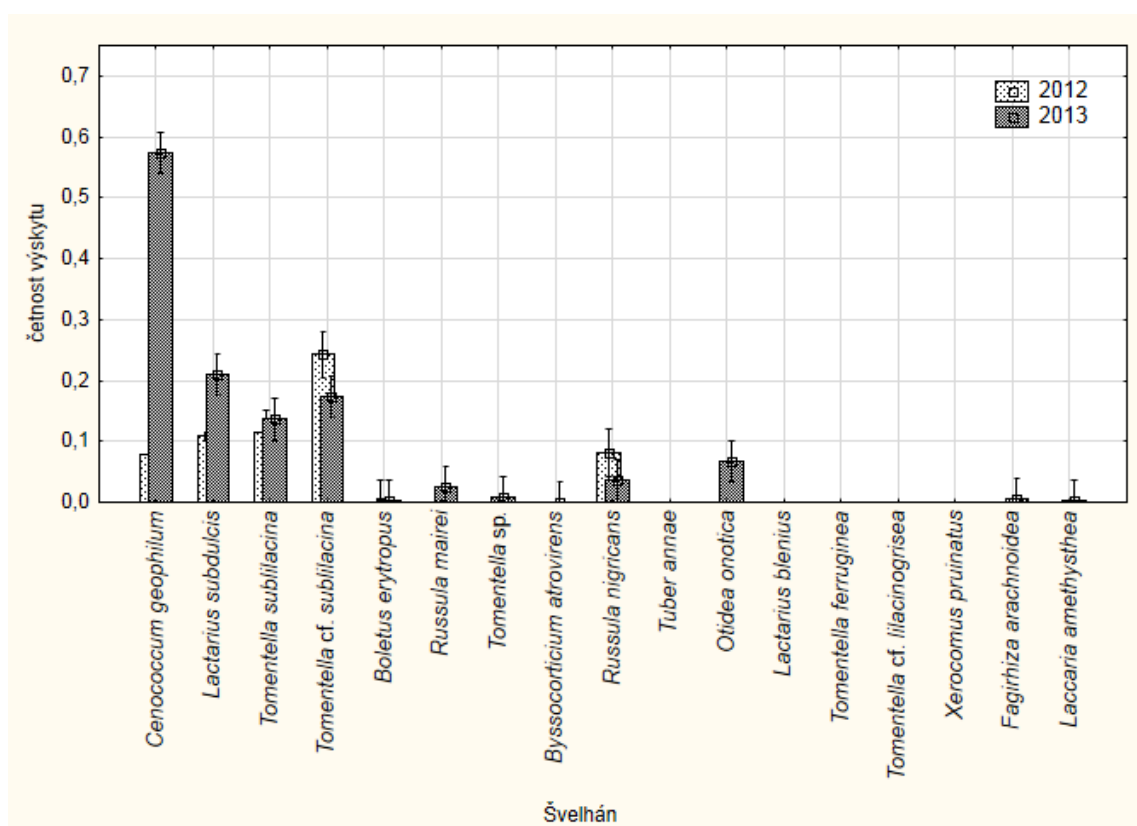
Obr. 23: Sloupcové vynesení celkové četnosti jednotlivých druhů ECM hub na všech lokalitách v obou letech, průměr±SE

Pokud budeme hodnotit četnost druhů na konkrétních lokalitách, bude poněkud odlišná, hlavně při porovnání jednotlivých roků. Na lokalitě Švelhán v roce 2012 dominovala *Tomentella cf. sublilacina*, naopak v roce 2013 jednoznačně převyšoval ostatní druhy *Cenococcum geophilum*. Pro tuto lokalitu byly typické čtyři druhy ECM hub *Cenococcum geophilum*, *Lactarius subdulcis*, *Tomentella sublilacina* a *Tomentella cf. sublilacina*. Četnosti jednotlivých druhů na lokalitě Švelhán jsou vyneseny v grafu na Obr. 24.

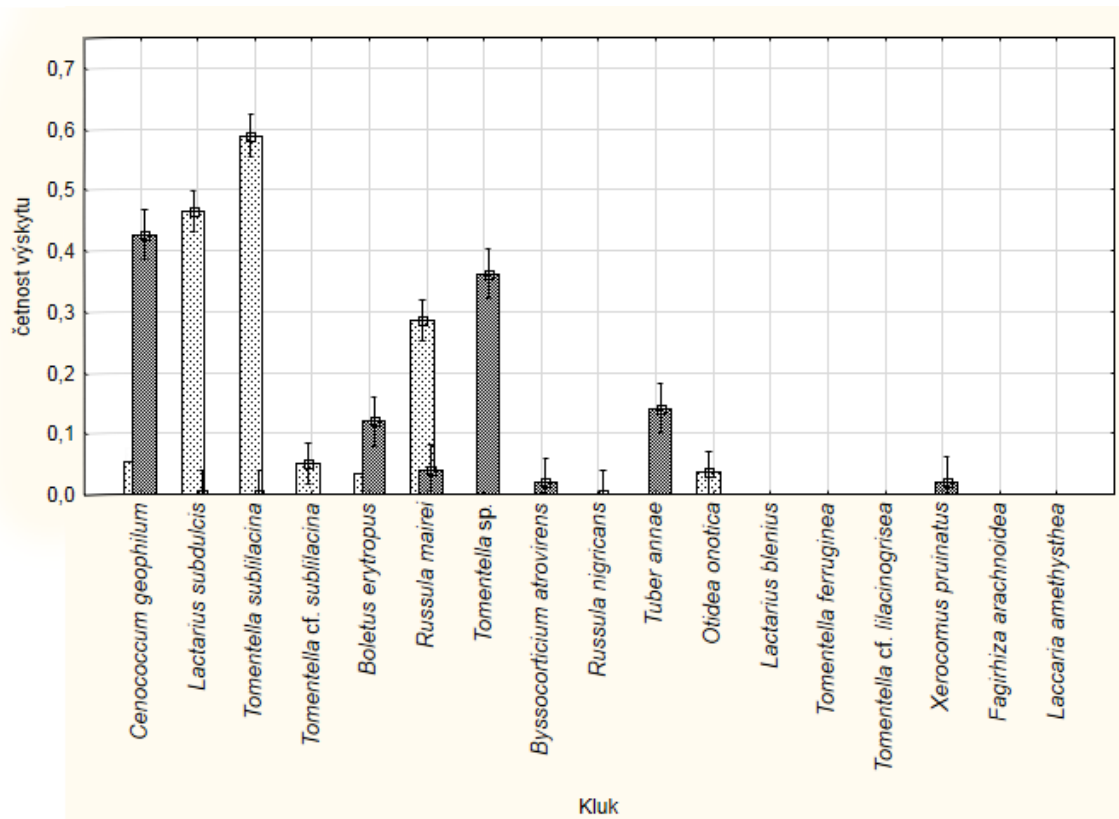
Při pohledu na vynesené četnosti na lokalitě Kluk, viz graf na Obr. 25, vidíme v roce 2012 dominanci druhů *Tomentella sublilacina* a *Lactarius subdulcis*. Naopak v roce 2013 dominovaly druhy *Cenococcum geophilum* a *Tomentella sp.*. Celkově je lokalita Kluk

typická vyšším výskytem druhů *Cenococcum geophilum*, *Tomentella sublilacina*, *Lactarius subdulcis*, *Tomentella sp.* a *Russula mairei*.

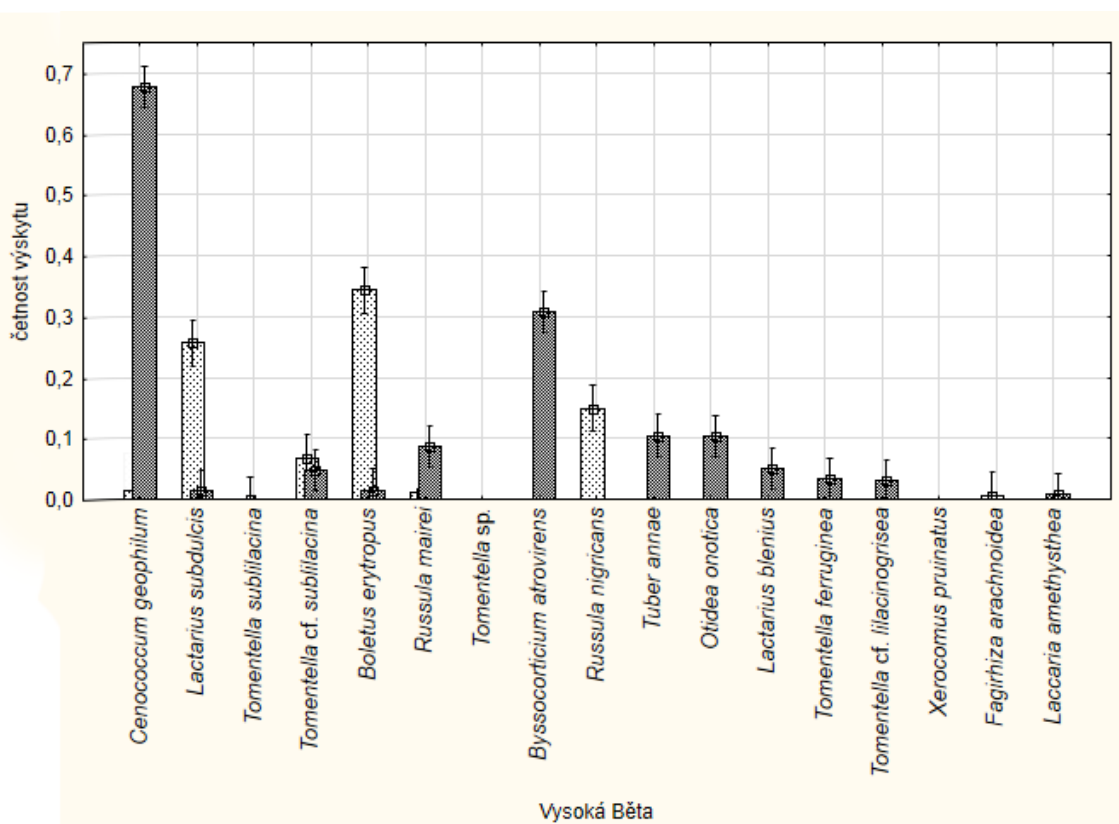
Poslední lokalita Vysoká Běta byla v roce 2012 typická dominancí dvojice druhů *Lactarius subdulcis* a *Boletus erythropus*, s vyšším výskytem byla také přítomna *Russula nigricans*. Naopak v roce 2013 byl největší četností charakteristický *Cenococcum geophilum* následovaný druhem *Byssocorticiium atrovirens*. Pro tuto lokalitu jsou typické druhy *Cenococcum geophilum*, *Boletus erythropus*, *Byssocorticiium atrovirens* a *Lactarius subdulcis*. Četnosti jednotlivých druhů na lokalitě Vysoká Běta jsou vyneseny v grafu na Obr. 26.



Obr. 24: Sloupcový graf zobrazující celkové četnosti jednotlivých druhů ECM hub v obou letech na lokalitě Švelhán, průměr±SE



Obr. 25: Sloupcový graf zobrazující celkové četnosti jednotlivých druhů ECM hub v obou letech na lokalitě Kluk, průměr±SE



Obr. 26: Sloupcový graf zobrazující celkové četnosti jednotlivých druhů ECM hub v obou letech na lokalitě Vysoká Běta, průměr±SE

4. Diskuze

4.1 Nalezené druhy, druhová bohatost a Shannonův index

Celkem bylo na třech pokusných lokalitách identifikováno 17 druhů ECM hub. Pokud tento výsledek porovnáme s podobnými pokusy prováděnými v bukových porostech, je tento počet relativně nízký. Goicoechea *et al.*, (2009) našel na třech lokalitách podobných rozměrů 40 druhů ECM hub. Grebenc & Kraigher (2007) ve své práci identifikovali 31 různých morfotypů a Pena *et al.*, (2010) dokonce 55 různých druhů. Podobně jak v pokusu Pena *et al.*, (2010) se počet identifikovaných druhů pohyboval ve studiích Taylor *et al.*, (2000) a Rumberger *et al.*, (2004). Největší druhová bohatost byla pozorována při studii Buée *et al.*, (2005), ve které se podařilo identifikovat přes 60 druhů ECM hub. Výrazný rozdíl v počtu nalezených druhů lze vysvětlit tím, že v rámci naší práce byly vzorky odebírány pouze v měsíci září a říjen, naopak ve zmíněných studiích byly vzorky odebírány v průběhu celého roku. Poslední jmenovaná práce Buée *et al.*, (2005) probíhala v několika letech s odběrem v každém měsíci a to dokonce i v zimním období, zároveň pokusná plocha byla značně větší. Z těchto poznatků můžeme dedukovat značnou druhovou variabilitu v průběhu roku, k podobným poznatkům dochází i práce Pena *et al.*, (2010).

Jednotlivé lokality se v počtech nalezených druhů výrazně nelišily. Na lokalitě Švelhán a Kluk bylo nalezeno 11 druhů, na poslední lokalitě Vysoká Běta bylo identifikováno 14 ECM hub. 41 % nalezených druhů se vyskytovalo na všech lokalitách zároveň. K podobně vyrovnaným hodnotám počtů druhů hub bylo dosaženo ve studii Goicoechea *et al.*, (2009), kde bylo identifikováno 24 druhů na první a druhé lokalitě a na poslední sledované lokalitě byl počet nalezených druhů 25. Druhové překrytí mezi jednotlivými lokalitami dosahovalo 27,5 %.

Výrazná odlišnost v počtu druhů v roce 2012 (10 druhů) a v roce 2013 (16 druhů) lze vysvětlit sezónní variabilitou, rozdílností srážek v období před sběrem (15 % rozdíl), případně i chybou začátečníka v prvním období.

Druhovú diverzitu ECM hub byla kromě celkového počtu nalezených druhů hodnocena také výpočtem druhové bohatosti (d) a Shannonovým indexem (H). Z vypočtených hodnot druhové bohatosti (d) uvedených v Tab. 4 je vidět, že hodnoty druhové bohatosti jsou na všech lokalitách větší v roce 2013. Pokud bychom porovnávali druhovou bohatost jen v rámci jednotlivých lokalit bez ohledu na roku sběru, největší bohatost byla naměřena na lokalitě Vysoká Běta ($d = 5,01$). V porovnání s podobnou studií v bučinách Kraigher *et al.*, (2007) ($d = 2,9$) je námi naměřená hodnota větší. Rozdíl je možno vysvětlit odlišností oblastí, nestejně velkými testovanými plochami a odběru většího množství vzorků po celý rok v práci Kraigher *et al.*, (2007).

Vypočtené hodnoty Shannonova indexu diverzity (H) shrnuje Tab. 5. Nejnižší hodnota Shannonova indexu byla naměřena na lokalitě Švelhán ($H = 1,70$), tuto hodnotu lze považovat za relativně nízkou. Naopak průměrné hodnoty Shannonova indexu byly získány z dat na lokalitách Kluk ($H = 2,35$) a Vysoká Běta ($H = 2,16$). Pokud bychom tyto hodnoty porovnávali se studii zaměřenými na diverzitu ECM hub v bukových porostech, jsou naše hodnoty Shannonova indexu podobné. Ve studii Kraigher *et al.*, (2007) byl v přirozeném bukovém lese Shannonův index $H = 2,1$ a podobně i v práci Goicoechea *et al.*, (2009). Zde byl získán Shannonův index $H = 2,63$.

4.2 Četnost výskytu ektomykorhiz v závislosti na horizontu, lokalitě a roce

4.2.1 Rok

Dle výsledků ze statistické analýzy ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$) se četnost výskytu ECM hub signifikantně ($p \leq 0,05$) odlišovala mezi jednotlivými roky. Na grafu na Obr. 16 lze pozorovat výrazně vyšší výskyt ECM hub v druhém roce. Jak již bylo naznačeno

v předchozí kapitole, druhové složení a míra výskytu ECM hub je překvapivě časově výrazně proměnlivá. Za hlavní faktory vedoucí k těmto změnám jsou považovány abiotické faktory prostředí (Buée *et al.*, 2005). Podle dalších zjištění však nejsou tyto faktory jedinými činiteli měnící druhové složení a četnost ECM hub v bukových porostech. Předpokládá se, že na těchto změnách se dále podílí také množství živin, které stromy poskytují ECM houbám. Tento faktor pak dále závisí na intenzitě fotosyntézy a respirace, schopnosti přenosu asimilátů z listů do kořenového systému a mobilizace energetických zásob v nepříznivých podmínkách (Goicoechea *et al.*, 2009).

4.2.2 Horizont

Po vyhodnocení dat analýzou ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$) se četnost výskytu ECM hub v závislosti na půdním horizontu signifikantně ($p \leq 0,05$) měnila. Významně větší výskyt byl zaznamenán v humusovém horizontu, viz graf na Obr. 17. Četnost výskytu byla o 35 % větší než v minerálním. V porovnání s ostatními studii je tato hodnota poněkud vyšší. Pritsch *et al.*, (2009) prokázal v podobné studii také dominanci humusového horizontu, nicméně rozdíl nebyl tak velký. Rozdíl mezi horizonty činil necelých 20 %. V rámci naší studie nebyla prokázána žádná druhová preference jednotlivých ECM hub a půdních horizontů. Naopak v pracích Courty *et al.*, (2008) byla u některých druhů ECM hub prokázána preference půdního profilu. Heinonsalo *et al.*, (2001) a Rosling *et al.*, (2004) například prokázali preferenci druhu *Cenococcum geophilum* pro minerální půdní horizont.

4.2.3 Lokalita

I v případě faktoru lokality byla analýzou ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$) prokázána odlišnost ($p \leq 0,05$) v četnosti výskytu ECM hub. Největší četnost byla zaznamenána na lokalitě Kluk, o něco nižší na lokalitě Vysoká Běta a nejnižší na lokalitě Švelhán, viz graf na Obr. 18. Signifikantní odchylka byla prokázána mezi lokalitou Švelhán a Kluk. Podobné odlišení blízkých lokalit ukázaly i jiné studie (Wubet *et al.*, 2013). Rozdíl v četnostech lze vysvětlit vysokou prostorovou různorodostí ECM hub, která úzce závisí na malých změnách abiotických faktorů půdního prostředí (Wubet *et al.*, 2013).

4.3 Explorační typy

Z našich dat je patrné, že četnost výskytu ECM hub v jednotlivých exploračních typech je relativně vyrovnaná kromě exploračního typu s krátkými hyfami, který výrazně převyšuje ostatní typy. Po vyhodnocení dat analýzou ANOVA repeated measurement ($\alpha < 0,05$) je explorační typ s krátkými hyfami signifikantně ($p \leq 0,05$) odlišný od zbylých skupin. Agerer *et al.*, (2002) navrhoval rovnoměrnou koexistenci všech typů exploračních skupin. Tuto domněnku zakládal na výhodnosti soužití ECM hub různých exploračních skupin v konkrétním prostoru. Vzhledem k tomu, že explorační typy určují hlavně strategii ve způsobu získávání živin, je výhodné, aby různé druhy z různých exploračních skupin koexistovaly na určitých místech společně, a tak si pomyslně rozdělily dostupné živiny. Tuto hypotézu částečně potvrzuje studie Bubner *et al.*, (2013), ve které se ukázalo stabilní zastoupení jednotlivých exploračních skupin. Pokud dominantní druh z určitého místa ustoupil, nahradil ho jiný druh stejného exploračního typu.

V našem případě, ale významně dominoval typ s krátkými hyfami. Tuto skutečnost lze vysvětlit přítomností dominantního druhu *Cenococcum geophilum*, který patří právě do exploračního typu s krátkými hyfami. Tento druh je nejčastějším zástupcem ECM hub řazeného tohoto exploračního typu. *Cenococcum geophilum* je typický dobře rozvinutým pláštěm s emanačními hyfami, které mu umožňují přijímat velké množství minerálních živin pro hostitelské stromy (Agerer 2006).

4.4 Četnost jednotlivých druhů ECM hub

Při porovnání celkové četnosti druhů na všech lokalitách lze jednoznačně vyzorovat silnou dominanci druhu *Cenococcum geophilum*, další dva druhy *Lactarius subdulcis* a *Tomentella sublilacina* lze považovat také za četné. Ostatní druhy se vyskytovaly již daleko méně a největší skupina identifikovaných ECM hub byla charakteristická velice malou četností. Řada studií ukazuje podobný model s dominance několika druhů doplněná velkým počtem druhů s malou četností výskytu (Allen *et al.*, 2000). Například Courty *et al.*, (2008) pozoroval dominanci 4 druhů, zbylé druhy se vyskytovaly jen v nízkých četnostech. Stejně tak i námi pozorovaná dominance druhu *Cenococcum geophilum* byla zaznamenána ve

studiích (Grebenc & Kraigher 2007, Goicoechea *et al.*, 2009). *Cenococcum geophilum* je znám jako kosmopolitní a ubikvitní druh, který je schopen kolonizovat kořeny širokého spektra hostitelských dřevin (Douhan & Rizzo 2005). Zároveň je tento druh znám i svou velkou četností v bukových porostech (Grebenc & Kraigher 2007). Výrazná asociace *Fagus sylvatica* a *Cenococcum geophilum* lze vysvětlit výhodností tohoto spojení. *Cenococcum geophilum* jakožto zástupce askomycet má větší rezistenci vůči nedostatku vody v porovnání s ostatními skupinami ECM hub (Coleman *et al.*, 1989). Dále byla prokázána větší metabolická aktivita tohoto druhu v bučinách (Jany *et al.*, 2002). Dále se předpokládá, že i některé areály výskytu buků jsou přímo závislé na dodatečném zvýšení příjmu vody umožněný ECM houbami (Ebert 1996).

Při pohledu na četnost druhů v jednotlivých lokalitách vidíme, že dominance druhů se výrazně odlišuje a to dokonce i v porovnání stejné lokality v různých letech. Dominance druhů na jednotlivých lokalitách ukazují grafy na Obr. 24, Obr. 25 a Obr. 26. Významná změna ve výskytu *Cenococcum geophilum* v prvním a druhém roce napříč všemi lokalitami lze vysvětlit dynamikou tohoto druhu v závislosti na abiotických faktorech. Buée *et al.*, (2005) pozoroval výraznou proměnlivost výskytu druhu *Cenococcum geophilum* během roku a také variabilitu v závislosti na množství srážek. Naopak nízkou četnost *Laccaria amethystea* lze vysvětlit jejím výskytem převážně v zimních měsících (Buée *et al.*, 2005).

5 Závěr

Ektomykorhizní houby jsou významnou součástí diverzity lesních ekosystémů mírného pásma. Při snaze o pochopení, jak je druhová diverzita ECM hub řízena určitými faktory, bylo v rámci chráněné krajinné oblasti Blanský les odebráno 106 půdních vzorků. Tyto vzorky byly zpracovány a jednotlivé morfotypy ECM hub určeny pomocí morfologických, anatomických znaků a DNA analýz.

Ze získaných dat bylo identifikováno 17 druhů ECM hub. Tento počet je vzhledem k rozsahu lokalit a časovému rozmezí sběrů přiměřený (Goicoechea *et al.*, 2009). Při porovnání podobných studií lze vysledovat, že se zvětšující se plochou odběru a rozložením odběrů v průběhu celého roku počet nalezených morfotypů v bukových porostech stoupá. Charakteristický je model několika dominantních druhů, které jsou doplněny velkým množstvím ECM hub s nízkou četností výskytu (Pena *et al.*, 2010). Při dostatečně dlouho trvajícím pokusu počty nalezených druhů ECM hub stoupají až k hodnotám kolem 60 druhů na 1 ha bučin (Buée *et al.*, 2005).

Dále se v rámci práce podařilo prokázat vliv půdního horizontu, lokality a roku na četnost výskytu ECM hub. Dominantním exploračním typem se ukázal být explorační typ s krátkými hyfami a to hlavně kvůli přítomnosti druhu *Cenococcum geophilum*. Četnost tohoto druhu výrazně převyšovala ostatní. Pokud se ale podíváme na konkrétní lokality v jednotlivých letech, dominanci zde převzaly i jiné druhy. *Cenococcum geophilum* je znám jako ubikvitní druh s velkou četností v bukových porostech (Grebenc & Kraigher 2007). Jeho nápadnou změnu v četnosti výskytu lze vysvětlit výraznou dynamikou výskytu tohoto druhu během sezóny (Buée *et al.*, 2005).

6 Seznam literatury

- Agerer R. & Rambold G. (2004 – 2013)** DEEMY –An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. München, Germany
<http://www.deemy.de/>
- Agerer R. (1987 – 2008)** Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Schwäbisch-Gmünd
EinhornVerlag.
- Agerer R. (1991)** Characterization of Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* **23**: 25 – 73
- Agerer R. (1995)** Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Eds AK Varma and B Hock pp. 685–734. Springer Verlag, Berlin, Germany
- Agerer R. (1999)** Never change a functionally successful principle: The evolution of Boletales s. l. (Hymenomyces, Basidiomycota) as seen from below-ground features. 6:5-91
- Agerer R. (2001)** Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* **11**: 107–114
- Agerer R. (2006)** Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* **5**: 67-107
- Agerer R., Danielson R. M., Egli S., Ingleby K., Luoma D. & Treu R. (1996 – 2006)**
Descriptions of Ectomycorrhizae. Schwäbisch-Gmünd: EinhornVerlag
- Agerer R., Grote R. & Raidl S. (2002)** The new method ‘micromapping’, a means to study species-specific associations and exclusions of ectomycorrhizae. *Mycological Progress* **1**: 155–166
- Allen, A. S., Andrews J. A., Finzi A. C., R. Matamala, Richter D. D. & Schlesinger W. H. (2000)** Effects of free-air CO₂ enrichment (FACE) on belowground processes in a *Pinus taeda* forest. *Ecological Applications* **10**: 437–448
- Anderson I. C. & Cairney J. W. G. (2007)** Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiology Reviews* **31**: 388–406

- Anderson I. C. & Parkin P. I. (2007)** Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods* **68**: 248–253
- Anderson I. C., Bastias B. A., Genney D. R., Parkin P. I. & Cairney J. W. G. (2007)** Basidiomycete fungal communities in Australian sclerophyll forest soil are altered by repeated prescribed burning. *Mycological Research* **111**: 482–286
- Barbour M. G., Burk J. H., Pitts W. D., William F. S. & Schwartz M. W. (1999)** Terrestrial plant ecology, 3rd edn. Benjamin/Cummings, CA
- Baxter J. W. & Dighton J. (2001)** Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host–symbiont culture conditions. *New Phytologist* **152**: 139–149
- Baxter J. W., Picket S. T. A., Carriero M. M. & Dighton J. (1999)** Ectomycorrhizal diversity and community structure in oak forest stands exposed to contrasting anthropogenic impacts. *Canadian Journal of Botany* **77**: 771–782
- Bent E., Kiekel P., Brenton R. & Taylor D. L. (2011)** Root-Associated Ectomycorrhizal Fungi Shared by Various Boreal Forest Seedlings Naturally Regenerating after a Fire in Interior Alaska and Correlation of Different Fungi with Host Growth Responses. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3351–3359
- Bougher N. L. (1995)** Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with eucalypts in Australia. *Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia* (eds. M. Brundrett, B. Dell, N. Malajczuk and G. Mingqin). Canberra, Australia: ACIAR Proceedings No. 62
- Branco S. & Ree R. H. (2010)** Serpentine Soils Do Not Limit Mycorrhizal Fungal Diversity. PLoS ONE 5(7) e11757. doi:10.1371/journal.pone.0011757
- Brand F. (1991)** Ektomycorrhizen an *Fagus sylvatica*. Charakterisierung und Identifizierung, ökologische Kennzeichnung und unsterile Kultivierung. Libri Botanici, IHW-Verlag : 1-229
- Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grove T. & Malajczuk N. (1996)** Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Canberra, Australia: ACIAR
- Brussaard L., Behan-Pelletier V. M., Bignell D. E., Brown V. K., Didden W., Folgarait P., Fragoso C., Freckmann D. W., Gupta V. V. S. R., Hattori T., Hawksworth D. L.,**

- Klopatek C., Lavelle P., Malloch D. W., Rusek J., Söderström B., Tiedje J. M. & Virginia R. A. (1997)** Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio* **26**: 563-570
- Bubner B., Fladung M., Lentzsch P., Münzenberger B., & Hüttl R. F. (2013)** Individual tree genotypes do not explain ectomycorrhizal biodiversity in soil cores of a pure stand of beech (*Fagus sylvatica* L.) *Trees* **27**: 1327–1338
- Buée M., Courty P. E., Mignot D. & Garbaye J. (2007)** Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1947–1955
- Buée M., Vairelles D. & Garbaye J. (2005)** Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* **15**: 235–245
- Burke D. J., Martin K. J., Rygielwicz P. T. & Topa M. A. (2005)** Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled samples: terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1683–1694
- Burke D. J., Smemo K. J. & Hewins CH. R. (2013)** Ectomycorrhizal fungi isolated from old-growth northern hardwood forest display variability in extracellular enzyme activity in the presence of plant litter. *Soil Biology & Biochemistry* **68**: 219-222
- 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
- Coleman M. D., Bledsoe C.S. & Lopushinsky W. (1989)** Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Canadian Journal of Botany* **67**: 29 – 39
- Courty P. E., Frank A., Pierrat J. C. & Garbaye J. (2008)** Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 5792–5801
- Cullings K. W., Vogler D., Parker V. & Finley S. K. (2000)** Ectomycorrhizal specificity patterns in a mixed *Pinus contorta* and *Picea engelmannii* forest in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4988–4991
- Davies F. T. Jr, Svenson S. E., Cole J. C., Phavaphutanon L., Duray S. A., Olalde-Portugal V., Meier C. E. & Bo S. H. (1996)** Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiologist* **16**: 985–993

- de Roman M., Claveria V. & De Miguel A. A. (2005)** A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycological Research* **109**: 1063–1104
- Dehlin H., Nilsson M. C., Wardle D. A. & Shevtsova A. (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
- Dentinger B. T. M., Didukh M. Y. & Moncalvo J. M. (2011)** Comparing COI and ITS as DNA Barcode Markers for Mushrooms and Allies (Agaricomycotina). *PLoS ONE* **6**: e25081
- di Marino E., Montecchio L., Scattolin L., Abs C. & Agerer R. (2008)** The ectomycorrhizal community structure in beech coppices differing in age and stand features. Scuola Di Dottorato
- di Pietro M., Churin J.-L. & Garbaye J. (2007)** Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. *Mycorrhiza* **17**: 547–550
- Dickie I. A., Xu B. & Koide R. T. (2002)** Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* **156**: 527–535
- Dighton J., Mason P. A. & Poskitt J. M. (1990)** Use of P-32 to measure phosphate uptake by birch mycorrhizas. *New Phytologist* **116**: 655–661
- Douhan G. W. & Rizzo D.M. (2005)** Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist* **166**: 263-71
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15
- Druebert Ch., Lang Ch., Valtanen K. & Polle A. (2009)** Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. *Plant, Cell and Environment* **32**: 992–1003
- Ebert H. P. (1996)** Klimaänderung und Baumartenentwicklung. *Forst Holz* **51**: 802–804
- Erland S., Taylor A. F. S. (2002)** Diversity of ecto-mycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden, M.G.A., Sanders, I.R. (Eds), Ecological Studies. *Mycorrhizal Ecology*, vol. 157. Springer Berlin Heidelberg, New York.
- Ferris R., Peace A. & Newton A. (2000)** Macrofungal communities of lowland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten.) plantations in England: relationships with site factors and stand structure. *Forrest Ecological Management* **131**: 255–267

- Garbaye J. (1994)** Helper bacteria—a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **128**: 197–210
- Gardes M. & Bruns T. D. (1993)** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 1–6
- Gehring C. & Whitham T. (2002)** Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. In: van der Heijden, M., Sanders, I. (Eds.), *Mycorrhizal Ecology*. Ecological Studies, vol. 157 Springer, Berlin, pp. 295–316
- Gehring C. A. & Bennett A. (2009)** Mycorrhizal fungal-plant-insect interactions: the importance of a community approach. *Environmental Entomology* **38**: 93–102
- Gehring C., Theimer T., Whitman T. & Keim P. (1998)** Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* **79**: 1562–1572
- Genney D. R., Anderson I. C. & Alexander I. J. (2006)** Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* **170**: 381–390
- Goicoechea N., Closa I., de Miguel A. M. (2009)** Ectomycorrhizal communities within beech (*Fagus sylvatica* L.) forests that naturally regenerate from clear-cutting in northern Spain *New Forests* **38**: 157–175
- Goodman D. M., Durall D. M., Trofymow J. A. & Berch S. M. (1996)** A manual of Concise Descriptions of North American Ectomycorrhizae including microscopic and molecular characterization. Canadian Forest Service and the B.C. Ministry of Forests
- Grebenc T. & Kraigher H. (2007)** Types of Ectomycorrhiza of Mature Beech and Spruce at Ozone-Fumigated and Control Forest Plots. *Environmental Monitoring and Assessment* **128**: 47–59
- Grebenc T., Christensen M., Vilhar U., Čaater M., Martin M. P., Simoniči P. & Kraigher H. (2009)** Response of ectomycorrhizal community structure to gap opening in natural and managed temperate beech-dominated forests. *Canadian Journal of Forest Research* **39**: 1375–1386
- Grillo O. & G Venora G. (2011)** *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*. Intech, pp. 27-52

- Gryndler M., Baláž M., Hrdlová H., Jansa J. & Vosátka M. (2004)** Mykorhizní symbióza. O soužití hub s kořeny rostlin. Praha: Academia
- Hedh J., Johansson T. & Tunlid A. (2009)** Variation in host specificity and gene content in strains from genetically isolated lineages of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycorrhiza*. **19**: 549-58
- Heinonsalo J., Jorgensen K. S. & Sen R. (2001)** Microcosm-based analyses of Scots pine seedling growth, ectomycorrhizal fungal community structure and bacterial carbon utilization profiles in boreal forest humus and underlying illuvial mineral horizons. *FEMS Microbiological Ecology* **36**: 73–84
- Henrion B., Le Tacon F. & Martin F. (1992)** Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* **122**: 289–298
- Ingleby K., Mason P. A., Last F. T. & Fleming L. V. (1990)** Identification of ectomycorrhizas. London, HMSO, 112 pp
- Jakucs E., Ganyec S. & Erős-Honti Z. (2008)** "*Fagihiza asteromustrata*" + *Fagus sylvatica* L. In: Agerer, R., Danielson, R. M., Egli, S., Ingleby, K., Luoma, D., Treu, R. (eds.) *Descriptions of Ectomycorrhizae* **9/10**: 31-35
- Jakucs E., Kovacs G. M., Szedlay G. & Eros Honti Z. (2005)** Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad leaved forests of the Hungarian Plain. *Mycorrhiza* **15**: 459-470
- Jany J. L., Garbaye J. & Martin F. (2002)** *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist* **154**: 651–659
- Jones M. D., Durall D. M., Hariman S. M. K., Classen D. & Simard S. (1997)** Ectomycorrhizal diversity on *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii* seedlings grown in the greenhouse or outplanted in single species and mixed plots in southern British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* **27**: 1872–1889
- Jonsson L. M., Nilsson M. C., Wardle D. A. & Zackrisson O. (2001)** Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* **93**: 353–364
- Karin Pritsch K., Esperschuetz .J., Haesler F., Raidl S., Winkler B. & Schloter M. (2009)** Structure and activities of ectomycorrhizal and microbial communities in the

rhizosphere of *Fagus sylvatica* under ozone and pathogen stress in a lysimeter study. *Plant Soil* **323**: 97–109

Kernaghan G. (2005) Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia* **49**: 511—520

Kernaghan G., Widden P., Bergeron Y., Le´gare´ S. & Pare´ D. (2003) Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos* **102**: 497–505

Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. & Stalpers J. A. (2008) Dictionary of the Fungi. 10th Edition. CABI Publishing. Wallingford, UK

Kjøller R., Parrent J., Taylor A., Vrålstad T., Larson E., Kõljalg U., Schumacher I.A. & Schumacher T. (2007) Identifying ectomycorrhizal fungi. Biological institut, University of Copenhagen

Koide R. T., Fernandez CH. & Petprakob K. (2011) General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* **68**: 45–55

Kraigher H., Petkovšek S. S., Grebenc T. & Simončič P. (2007) Types of Ectomycorrhiza as Pollution Stress Indicators: Case Studies in Slovenia. *Environmental Monitoring and Assessment* **128**: 31–45

Kranabetter J. M., Durall D. M. & MacKenzie W. H. (2009) Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza* **19**: 99-111

Kretzer A., Li Y. N., Szaro T. & Bruns T. D. (1996) Internal transcribed spacer sequences from recognized species of *Suillus sensulato*: phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* **88**: 776–785

Kuikka K., Härmä E., Markkola A., Rautio P., Roitto M., Saikkonen K., Ahonen-Jonnarth U., Finlay R. & Tuomi J. (2003) Severe defoliation of Scots pine reduces reproductive investment by ectomycorrhizal symbionts. *Ecology* **84**: 2051–2061

Malloch D. W., Pirozynski K. A. & Raven P. H. (1980) Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**: 2113-2118

Markkola A. M., Ahonen-Jonnarth U., Roitto M., Strömmer R. & Hyvärinen M. (2002) Shift in ectomycorrhizal community composition in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedling

roots as a response to nickel deposition and removal of lichen cover Original Research Article *Environmental Pollution*, Volume 120, Issue 3, December 2002, Pages 797-803

Molina R., Massicotte H. & Trappe J. M. (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M.F., ed. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant fungal process*. New York, USA: Chapman and Hall, 357-423

Morris M., Smith M. E., Rizzo D. M., Rejmanek M. & Bledsoe S. (2008) Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytologist* **178**: 167–176

Naeem S., Thompson L. J., Lawler S. P., Lawton J. H. & Woodfin R. M. (1994) Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature* 368: 734–737

Pena R., Offermann CH., Simon J., Naumann P. S., Geßler A., Holst J., Dannenmann M., Mayer H., Kögel-Knabner I., Rennenberg H. & Polle A. (2010) Girdling Affects Ectomycorrhizal Fungal (EMF) Diversity and Reveals Functional Differences in EMF Community Composition in a Beech Forest, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1831–1841

Podila G. K. (2002) Signaling in mycorrhizal symbioses—elegant mutants lead the way. *New Phytologist* **154**: 541–545

Qu L., Makoto K., Choi D. S., Quoreshi A. M. & Koike T. (2009) The Role of Ectomycorrhiza in Boreal Forest Ecosystem. *Permafrost Ecosystems Ecological Studies* Volume 209, pp 413-425

Rey A. & Jarvis P. G. (1997) Growth response of young birch trees (*Betula pendula* Roth.) after four and a half years of CO₂ exposure. *Annals of Botany* **80**: 809–816

Rinaldi A. C., Comandini O. & Kuyper T. W. (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* **33**: 1-45

Rineau F., Maurice J. P., Nys C., Voiry H. & Garbaye J. (2010) Forest liming durably impact the communities of ectomycorrhizas and fungal epigeous fruiting bodies. *Annals of Forest Science* 7(110)12

Rogers S. O. & Bendich A. J. (1985) Extraction of DNA from milligrams amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology* **5**: 69–76

- Rosling A., Landahl B. D. & Finlay R. D. (2004)** Carbon allocation to ectomycorrhizal roots and mycelium colonising different mineral substrates. *New Phytologist* **162**: 795–802
- Rühling A. & Tyler G. (1990)** Soil factors influencing the distribution of macrofungi in oak forests of southern Sweden. *Holoactic Ecology* **13**: 11–18
- Rumberger M. D., Munzenberger B., Bens O., Ehrig F., Lentzsch P. & Hüttl R. F. (2004)** Changes in diversity and storage function of ectomycorrhiza and soil organoprofile dynamics after introduction of beech into Scots pine forests. *Plant and Soil* **264**: 111–126
- Schmit J. P., Mueller G. M., Leacock P. R., Mata J. L., Wu Q. F. & Huang Y. (2005)** Assessment of tree species richness as a surrogate for macrofungal species richness. *Biological Conservation* **120**: 99–110
- Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C.A & Chen W. (2012)** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Open Application Information* **5**: 87-98
- Shi L., Guttenberger M., Kottke I. & Hampp R. (2002)** The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.) changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. *Mycorrhiza* **12**: 303–311
- Simard S. W., Perry D. A., Jones M. D., Myrold D. D., Durall D. M. & Molina R. (1997)** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**: 579–582
- Smith J. E., Molina R., Huso M. M. P., Luoma D. L., McKay D., Castellano M. A., Lebel T. & Valachovic Y. (2002)** Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Canadian Journal of Botany* **80**: 186–204
- Smith S. E. & Read D. J. (2008)** Micorrhizal symbiosis, 3rd edn. Academic Press, London
- Söderström B. (2002)** Challenges for mycorrhizal research into the new millennium. *Plant and Soil* **244**: 1–7
- Suz L. M., Azul A. M., Morris M. H., Bledsoe C. S. & Martín M. P. (2008)** Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. *Soil Biology* **15**, DOI: 10.1007/978-3-540-75575-3

- Taylor A. (2002)** Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant Soil* **244**: 19–28
- Taylor A. F. S. & Alexander I. (2005)** The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world *Mycologist*, Volume 19, Part 3 August 2005. ©The British Mycological Society Printed in the United Kingdom
- Taylor, A. F. S., Martin F. & Read D. J. (2000)** Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica*, L.) along north-south transects in Europe, p. 343–365 In E. D. Schulze (ed.), Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems. Ecological studies, vol. 142. Springer Verlag, Berlin, Germany
- Tedersoo L., Koljalg U., Hallenberg N. & Larsson K. H. (2003)** Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* **159**: 153–165
- Tratnik N. V. & Pohleven F. (1995)** Sukcesija in interakcija gliv povzročiteljic piravosti bukovine. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* **46**: 163–176
- van der Heijden M. (1998)** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69-72
- Vierheilig H. & Piche Y. (2002)** Signaling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. In: Busling, B.S., Manthey, J.A. (Eds.), Flavonoids in Cell Function. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 505. Kluwer Academic, New York, pp. 23–39
- Wallenda T. & Kottke I. (1998)** Nitrogen deposition and ectomycorrhizas. *New Phytologist* **139**: 169–187
- Waltert B., Wiemken V., Rusterholz H., Boller T. & Baur B. (2002)** Disturbance of forest by trampling: Effects on mycorrhizal roots of seedlings and mature trees of *Fagus sylvatica*. *Plant and Soil* **243**: 143–154
- Wang B. & Qiu Y. L. (2006)** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizae in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–636
- White T. J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp 315–322

Wubet T., Christ S., Schöning I., Boch S. & Gawlich M. (2012) Differences in Soil Fungal Communities between European Beech (*Fagus sylvatica* L.) Dominated Forests Are Related to Soil and Understory Vegetation. PLoS ONE 7(10): e47500

Zak D. R., Holmes W. E., White D. C., Peacock A. D. & Tilman D. (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? *Ecology* 84: 2042–2050

Zar J. H. (1996) Biostatistical analysis, 3rd edn. Prentice Hall International, London

Internetové databaze ECM hub

- DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. München, Germany

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

- Morphotype Descriptions of Common Ectomycorrhizae Fungi

http://www.for.gov.bc.ca/rni/research/Date_Creek/...Table/Mycorrhizae.htm/

- Ectomycorrhizal morphotypes (MT) on roots of beech (*Fagus sylvatica*) in an old-growth forest

http://aem.asm.org/content/suppl/2010/02/26/76.6.1831.DC1/Supplement_MT.pdf

- Georg-August-Universität Göttingen

<http://www.uni-goettingen.de/en/92389.html>

7 Příloha

7.1 Příloha 1 - tabulky

Tab. 1: Přehled všech rodů hub podílející se na ektomykorzrhizní symbióze, upraveno podle Agerer (2006)

Zygomycetes (Zygomycota)

Endogonaceae [0/1(1)]: *Endogone*

Ascomycetes (Ascomycota)

Discinaceae [0/2(3)]: *Gymnohydnotria*, *Gyromitra*

Elaphomycetaceae [1/1(1)]: *ELAPHOMYCES*

Geoglossaceae [0/2(6)]: *Geoglossum*, *Spathularia*

Helotiaceae [1/2(100)]: *HYMENOSCYPHUS*, *Neocudoniella*

Helvellaceae [2/9(9)]: *BALSAMIA*, *Barssia*, *Fischerula*, *Helvella*, *Hydnotria*, *LEUCANGIUM*, *Underwoodia*, *Picoa*, *Wynnella*

Morchellaceae [1/2(3)]: *Morchella*, *Verpa*

Pezizaceae [1/10(19)]: *Amylascus*, *Boudiera*, *Hydnobolites*, *Hydnotryopsis*, *Pachyphloeus*, *Peziza*, *Plicaria*, *Ruhlandiella*, *SPHAEROZONE*, *Tirmania*,

Pyronemataceae [4/11(68)]: *GENEA*, *Geopora*, *HUMARIA*, *Hydnocystis*, *Nothojafnea*, *Phaeangium*, *Pulvinula*, *Sphaerosoma*, *SPHAEROSPORELLA*, *TRICHARINA*, *Wilcoxina*

Terfeziaceae [0/4(4)]: *Cazia*, *Delastria*, *Loculotuber*, *Terfezia*

Tuberaceae [1/6(6)]: *Choiromyces*, *Dingleya*, *Labyrinthomyces*, *Paradoxa*, *Reddellomyces*, *TUBER*

Hymenomyces (Basidiomycota)

Albatrellaceae [2/3(5)]: *ALBATRELLUS*, *POLYPORELETUS*, *Scutigera*

Amanitaceae [1/1(5)]: *AMANITA*

Atheliaceae [5/5(26)]: *AMPHINEMA*, *BYSSOCORTICIUM*, *BYSSOPORIA*, *PILODERMA*, *TYLOSPORA*

Bankeraceae [5/5(5)]: *BANKERA*, *BOLETOPSIS*, *HYDNELLUM*, *PHELLODON*, *SARCODON*

Bolbitiaceae [2/2(11)]: *DESCOMYCES*, *DESCOLEA*

Boletaceae [6/22(26)]: *Afroboletus*, *Aureoboletus*, *Austroboletus*, *Boletellus*, *BOLETUS*, *Chalciporus*, *CHAMONIXIA*,

Gastroboletus, *Gastroleccinum*, *Gastrotylopilus*, *LECCINUM*, *Paxillogaster*, *Phylloboletellus*, *Phylloporus*, *PORPHYRELLUS*, *Pulveroboletus*,

Royungia, *Strobilomyces*, *Tubosaeta*, *TYLOPILUS*, *Veloporphyrellus*, *XEROCOMUS*

Cantharellaceae [2/2(5)]: *CANTHARELLUS*, *CRATERELLUS*

Chondrogastraceae [0/1(1)]: *Chondrogaster*

Clavulinaceae [0/1(3)]: *Clavulina*

Cortinariaceae [8/14(31)]: *Annamika*, *CORTINARIUS*, *Cuphocybe*, *DERMOCYBE*, *Destuntzia*, *HEBELOMA*, *INOCYBE*, *Mackintoshia*,

Mycocomarantus, *NAUCORIA*, *ROZITES*, *Setchelliogaster*, *STEPHANOPUS*, *THANTEROGASTER*

Cribbeaceae [0/1(2)]: *Cribbea*, *Mycolevis*

Entolomataceae [1/2(8)]: *Clitopilus*, *ENTOLOMA*

Geastraceae [(1/2(7)]: *GEASTRUM*, *Radiigera*

Gomphaceae [2/2(11)]: *CLAVARIADELPHUS*, *GOMPHUS*

Gomphidiaceae [2/5(5)]: *Brauniellula*, *CHROOGOMPHUS*, *Cystogomphus*, *GOMPHIDIUS*, *Gomphogaster*

Gyroporaceae [1/2(2)]: *GYROPORUS*, *Rubinoboletus*

Hydnaceae [1/1(8)]: *HYDNUM*

Hydnangiaceae [1/4(4)]: *Hydnangium*, *LACCARIA*, *Maccangia*, *Podohydnangium*

Hygrophoraceae [1/2(10)]: *Camarophyllus*, *HYGROPHORUS*

Hymenochaetaceae [0/1(14)]: *Coltricia*

Hymenogastraceae [0/2(8)]: *Hymenogaster*, *Quadriscora*

Hysterangiaceae [1/2(11)]: *HYSTERANGIUM*, *Trappea*

Leucogastraceae [0/2(2)]: *Leucogaster*, *Leucophlebs*

Marasmiaceae [1/1(46)]: *RHODOCOLLYBIA*

Melanogastraceae [2/4(4)]: *ALPOVA*, *Corditubera*, *Hoehnelogaster*, *MELANAOGASTER*

Mesophelliaceae [0/4(6)]: *Andebbia*, *Castoreum*, *Gummiglobus*, *Mesophellia*

Octavianiaceae [1/2(2)]: *OCTAVIANA*, *Sclerogaster*

Paxillaceae [3/5(9)]: *Austrogaster*, *AUSTROPAXILLUS*, *Gymnopaxillus*, *GYRODON*, *PAXILLUS*

Ramariaceae [2/3(8)]: *Austrogautieria*, *GAUTIERIA*, *RAMARIA*

Rhizopogonaceae [1/1(2)]: *RHIZOPOGON*

Russulaceae [3/9(9)]: *ARCANGELIELLA*, *Cystangium*, *Elasmomyces*, *Gymnomyces*, *LACTARIUS*, *Macowanites*, *Martellia*, *RUSSULA*, *Zelleromyces*

Sebacinaceae [1/1(5)]: *SEBACINA*

Sclerodermataceae [3/4(7)]: *ASTRAEUS*, *Calostoma*, *PISOLITHUS*, *SCLERODERMA*

Suillaceae [2/4(4)]: *BOLETINUS*, *Gastrosuillus*, *Psiloboletinus*, *SUILLUS*

Thelephoraceae [4/6(12)]: *Amaurodon*, *Lenzitopsis*, *PSEUDOTOMENTELLA*, *THELEPHORA*, *TOMENTELLA*, *TOMENTELLOPSIS*

Tricholomataceae [2/4(107)]: *Catathelasma*, *Leucopaxillus*, *LYOPHYLLUM*, *TRICHOLOMA*

Truncocolumellaceae [1/1(1)]: *TRUNCOCOLUMELLA*

Tab. 2: Seznam ECM druhů hub schopných symbiotického svazku s bukem *Fagus sylvatica* a zařazení do exploračních typů, vytvořeno z de Roman et al., 2005 a Agerer & Rambold (2004 – 2013), contact = kontaktní explorační typ, short = explorační typ s krátkými hyfami, medium = explorační typ se středně dlouhými hyfami, long = explorační typ s dlouhými rhizomorfy

Druh	Explorační typ	Reference
<i>Agaricales</i>		Bueé, Vairelles & Garbaye (2004)
<i>Byssocorticium atrovirens</i>	short distance	Bueé et al (2004), Brand (1991)
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	medium distance mat	Iosifidou P, Raidl S (2006)
<i>Coenococcum geophilum</i>	short distance	Bueé et al (2004), Jany, Garbaye & Martin (2002)
<i>Coenococcum cristata</i>	short distance	Bueé et al (2004)
<i>Cortinarius</i>	medium distance fringe	Bueé et al (2004)
<i>Cortinarius bolaris</i>	medium distance fringe	Brand (1991), Brand (1992)
<i>Cortinarius cinnabarinus</i>	medium distance fringe	Brand (1991), Ceruti, Benvenuti & Mosca (1988)
<i>Cortinarius multiformis</i>	medium distance fringe	Ceruti et al (1988)
<i>Cortinarius nemorensis</i>	medium distance fringe	Ceruti et al (1988)
<i>Elaphomyces muricatus</i>	short distance	Brand (1991)
<i>Fagirhiza arachnoidea</i>	long distance	Brand (1992)
<i>Fagirhiza asteromustrata</i>	medium distance smooth	Jakucs E, Ganyec S, Erös-Honti Z (2008)
<i>Fagirhiza byssoporioides</i>	medium distance smooth	di Marino E, Montecchio L, Agerer R (2008)
<i>Fagirhiza cystidiophora</i>		Brand (1988)
<i>Fagirhiza entolomoides</i>	medium distance smooth	di Marino E, Montecchio L, Agerer R (2008)
<i>Fagirhiza fusca</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza globulifera</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza granulosa</i>		Brand (1988)
<i>Fagirhiza lanata</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza oleifera</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza pachyphloeae</i>	short distance	Erös-Honti Z, Jakucs E (2009)
<i>Fagirhiza pallida</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza rosea</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza setifera</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza spinulosa</i>		Brand (1991)
<i>Fagirhiza stellata</i>	medium distance smooth	di Marino E, Montecchio L, Agerer R (2008)
<i>Fagirhiza tubulosa</i>		Brand (1988)
<i>Fagirhiza vermiculiformis</i>		Jakucs & Agerer (1998)
<i>Gautieria inapire</i>	medium distance mat	Palfner (2001)
<i>Gastrum fimbriatum</i>	medium distance mat	Agerer & Beenken (1998)
<i>Genea</i>	short distance	Jakucs (2002)
<i>Genea hispidula</i>	short distance	Brand (1991)
<i>Hebeloma</i>	short distance	Bueé et al (2004)
<i>Hygrophorus penarius</i>	short distance	di Marino E, Montecchio L, Agerer R (2008)
<i>Inocybe</i>	short distance	Bueé et al (2004)
<i>Laccaria amethystina</i>	medium distance smooth	Bueé et al (2004), Brand (1988d)
<i>Laccaria laccata</i>	medium distance smooth	Ceruti et al (1988)

Tab. 2 (pokračování): Seznam ECM druhů hub schopných symbiotického svazku s bukem *Fagus sylvatica* a zařazení do exploračních typů, vytvořeno z de Roman et al., 2005 a Agerer & Rambold (2004 – 2013), contact = kontaktní explorační typ, short = explorační typ s krátkými hyfami, medium = explorační typ se středně dlouhými hyfami, long = explorační typ s dlouhými rhizomorfami

Druh	Exploratační typ	Reference
<i>Lactarius</i>	medium distance smooth	Bueé et al (2004)
<i>Lactarius acris</i>		Brand (1991), Brand (1992)
<i>Lactarius blennius</i>		Bueé et al (2004), Ceruti et al (1988)
<i>Lactarius camphoratus</i>		Brand (1991)
<i>Lactarius pallidus</i>		Brand (1991)
<i>Lactarius pterosporus</i>		Ceruti et al (1988)
<i>Lactarius rubrocinctus</i>		Brand (1991)
<i>Lactarius subdulcis</i>		Brand (1987), Bueé et al (2004)
<i>Lactarius vellereus</i>		Brand (1987)
<i>Piloderma croceum</i>	medium distance fringe	Brand (1991)
<i>Ramaria aurea</i>	medium distance mat	Agerer (1996)
<i>Ramaria spinulosa</i>	medium distance mat	Agerer (1996)
<i>Ramaria flavo-saponarea</i>	medium distance mat	Scattolin L, Raidl S (2006)
<i>Rhizopogon</i>	long distance	Al Sayegh & Kraigher (2000)
<i>Russula aurora</i>	contact	Beenken L (2004)
<i>Russula cyanoxantha</i>	medium distance smooth	Beenken (2001)
<i>Russula densifolia</i>	medium distance smooth	Beenken (2001), Ceruti et al (1988)
<i>Russula fellea</i>		Beenken L (2004)
<i>Russula foetens</i>	medium distance smooth	Beenken (2001)
<i>Russula illota</i>	medium distance smooth	Brand (1991)
<i>Russula laurocerasi</i>	medium distance smooth	Beenken L (2004)
<i>Russula ledpida</i>	medium distance smooth	Beenken L (2004)
<i>Russula mairei</i>	medium distance smooth	Brand (1991)
<i>Russula ochroleuca</i>	contact	Brand (1991)
<i>Russula olivacea</i>	short distance	Beenken L (2004)
<i>Russula raoultii</i>	contact	Beenken L (2004)
<i>Sphaerozone ostiolatum</i>	short distance	Brand F (1991)
<i>Scleroderma</i>	long distance	Bueé et al (2004)
<i>Tomentella</i>		Bradbury et al (1998), Bueé et al (2004)
<i>Tomentella ferruginea</i>		Raidl & Müller (1996), Raidl (1998)
<i>Tomentella acerbum</i>		Agerer & Waller (1993)
<i>Tomentella sciodes</i>		Brand (1992)
<i>Tomentellopsis submollis</i>	medium distance smooth	Agerer R, ed (1987-1998)
<i>Tricholoma acerbum</i>	medium distance fringe	Agerer R, Waller K (1993)
<i>Tricholoma sciodes</i>	medium distance fringe	Brand (1992)
<i>Tuber</i>		Bueé et al (2004)
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	long distance	Brand F (1989)

Tab. 3: Seznam identifikovaných ECM hub a jejich hlavní rozlišovací znaky

Druh	barva pláště	typ větvení	typ zakončení	povrch pláště	emanační hyfy	rhizomorfy
<i>Boletus erythropus</i>	žlutavě hnědý	monopodiálně pinátní	rovné	zrnitý s bradavičkami	ano	ano
<i>Byssocorticium atrovirens</i>	šedomodrá, stříbrná	monopodiálně pinátní	ohnuté	silně vláknitý	ano	ano, četné
<i>Cenococcum geophilum</i>	černá, čemohnědá	nevětvené	rovné	zrnitý, paličky	ne	ano, četné
<i>Fagihiza arachnoidea</i>	bílá	monopodiálně pinátní	ohnuté	řídce bavněný	ano, četné	ne
<i>Laccaria amethystea</i>	nařiaľověľá	nepravidelně pinátní	rovné	drsňý	ne	ne
<i>Lactarius blennius</i>	světle hnědá	monopodiálně pinátní	rovné	hladký	ano, řídce	ano, řídce
<i>Lactarius subdulcis</i>	hněďavá, okrová	monopodiálně pinátní	ohnuté	lesklý, hladký	ano	ano
<i>Otidea onotica</i>	žlutavý	monopodiálně pinátní	rovné	vlnatý	ano, četné	ano, četné
<i>Russula mairei</i>	bílá	monopodiálně pinátní	rovné	zrnitý	ano, řídce	ano, řídce
<i>Russula nigricans</i>	krémově bílá	monopodiálně pinátní	ohnuté	jemně chlupatý, lesklý	ne	ano
<i>Tomentella ferruginea</i>	černá, čemohnědá	nepravidelně pinátní	ohnuté	lesklý	ano	ano, řídce
<i>Tomentella cf. lilacinogrisea</i>	hněďá	monopodiálně pinátní	rovné	zrnitý	ano, četné	ne
<i>Tomentella sp.</i>	černá, čemohnědá	monopodiálně pinátní	rovné	drsňý	ano, četné	ano, řídce
<i>Tomentella cf. sublilacina</i>	světle hněďá	monopodiálně pinátní	rovné	drsňý	ano, četné	ano
<i>Tomentella sublilacina</i>	hněďá	monopodiálně pinátní	rovné	drsňý	ano	ano
<i>Tuber annae</i>	žlutavě hněďý	monopodiálně pinátní	paličkovité	zrnitý	ano, četné	ne
<i>Xerocomus pruinatus</i>	běľavý, běľový	monopodiálně pinátní	ohnuté	hrubý	ano	ne

7.2 Příloha 2 - protokoly

QIAGEN protokol

- Mechanická homogenizace ECM špičky tloučkem v mikrokumavce
- Přidání 400 µl Buffer AP 1 + 4 µl RNasy A a pokračování s homogenizací
- Inkubace v termobloku na 30 – 45 minut při teplotě 60 °C, následuje lehké promíslení překlápěním zkumavky
- Přidání 130 µl AP 2 a umístění mikrokumavek do ledu nebo chladícího zařízení
- Centrifugace po dobu 5 minut na 12 000 otáček za minutu (ot./min.)
- Přidání lyzátu na QIA sbudder mini spin coloumn
- Získaný roztok přenést do mikrokumavky a centrifugovat na 12 000 ot./min. po dobu 2 minut
- Přidání přibližně 675 µl AP 3 roztoku (Binding buffer), dochází k vysrážení DNA
- Odebrání cca 700 µl roztoku a přenesení do mikrokumavky s filtrem (DNasa mini spin column v 2 ml Collection tube)
- Centrifugace (12 000 ot./min.) po dobu 2 minut, na membráně zůstává zachycena DNA
- Vložení filtru s membránou do nové mikrokumavky a přidání 500 µl AW
- Centrifugace (12 000 ot./min.) po dobu 1 minuty
- Opakování předchozích dvou bodů postupu
- Centrifugace bez přidání 500 µl AW (12 000 ot./min.) po dobu 1 minuty
- Přidání 100 µl AE (Elution buffer) na kolonu pro uvolnění DNA z membrány
- Inkubace po dobu 5 minut za laboratorní teploty
- Centrifugace (12 000 ot./min.) po dobu 1 minuty
- Výsledný roztok obsahuje přečištěnou DNA a je připraven pro PCR

PCR protokol

PCR reakce byly připraveny dle následujícího protokolu:

Plain PP master mix –12,5 µl

ITS1F - 1,5 µl

ITS4 - 1,5 µl

H₂O - 10µl

PCR reakce dle Bent *et al.*, 2011 (40 cyklů) byla optimalizována na:

Id: 3 min –94°C

D: 2 min – 94°C

AN: 1min – 50°C

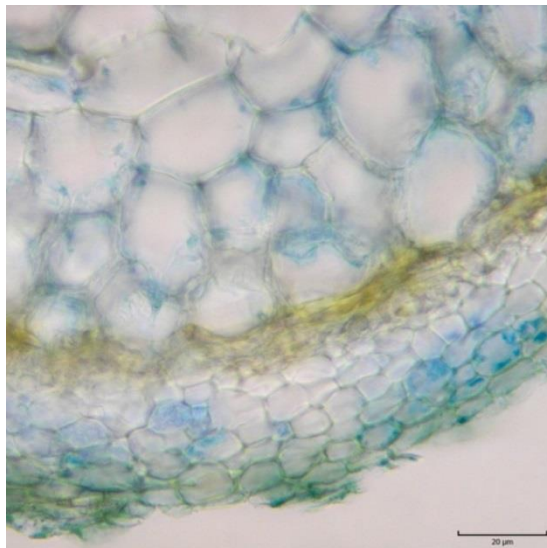
P: 2 min – 72°C

Final ex: 8 min – 72°C

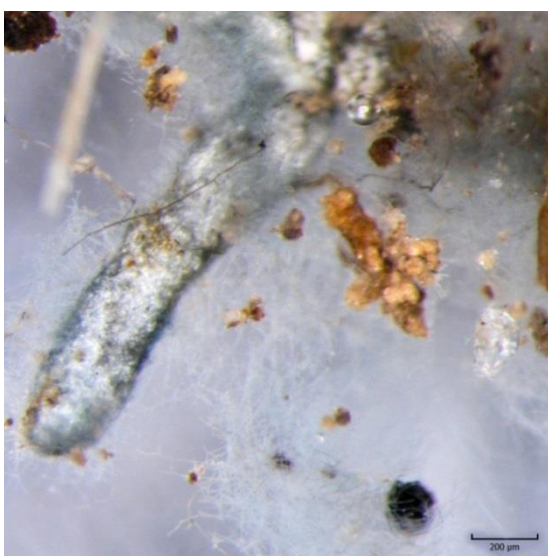
7.3 Příloha 3 - fotografie



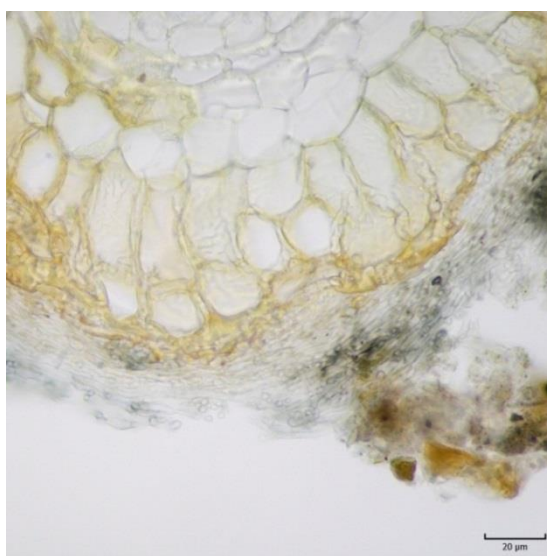
Obr. 1: *Boletus erythropus*



Obr. 2: *Boletus erythropus* příčný řez ECM špičkou



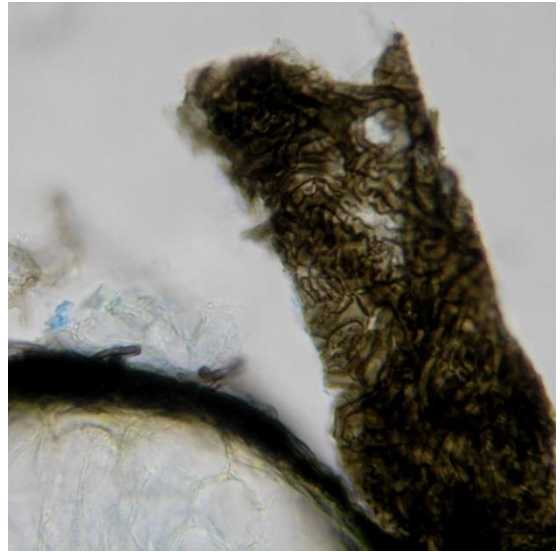
Obr. 3: *Byssocorticium atrovirens*



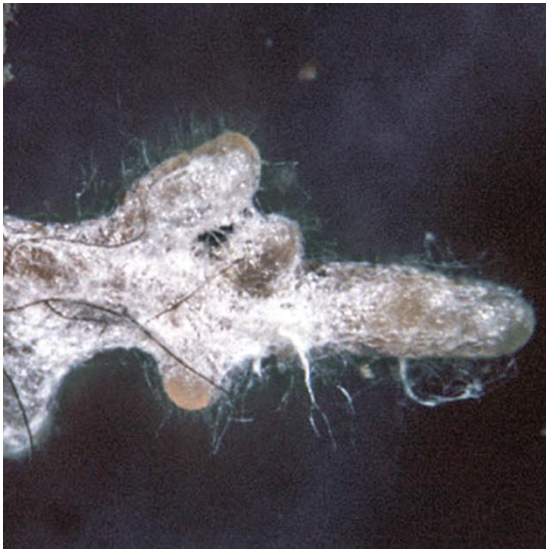
Obr. 4: *Byssocorticium atrovirens* příčný řez ECM špičkou



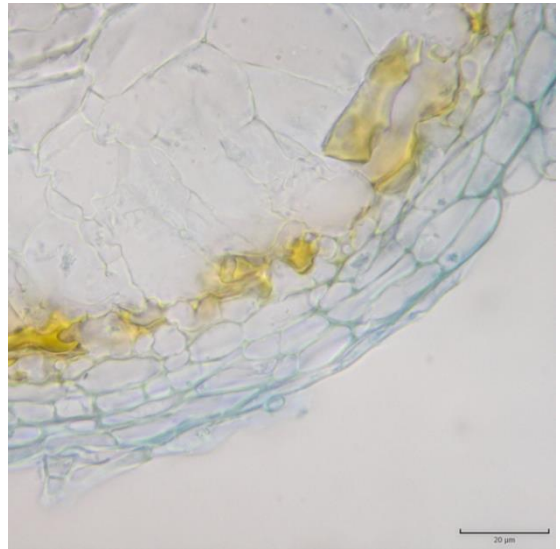
Obr. 5: *Cenococcum geophilum*



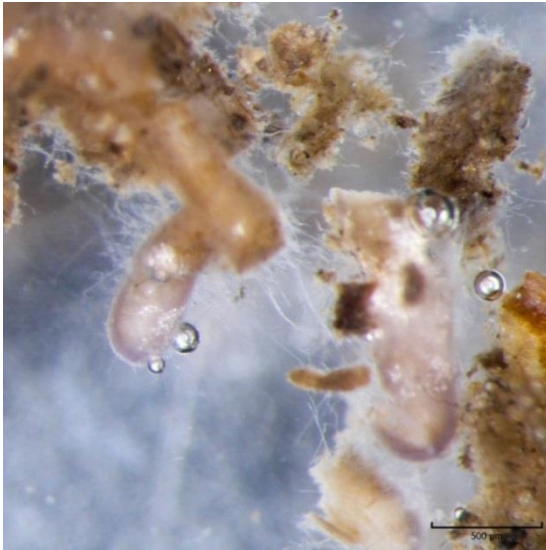
Obr. 6: *Cenococcum geophilum* příčný řez ECM špičkou a anatomický řez pláštěm



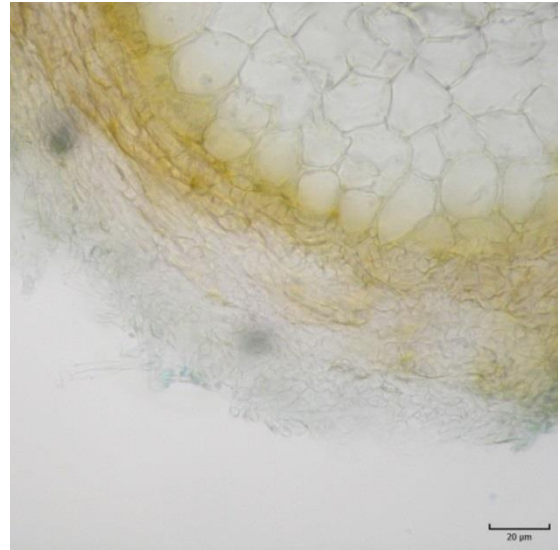
Obr. 7: *Fagirhiza arachnoidea*



Obr. 8: *Fagirhiza arachnoidea* příčný řez ECM špičkou



Obr. 9: *Laccaria amethystea*



Obr. 10: *Laccaria amethystea* příčný řez ECM špičkou



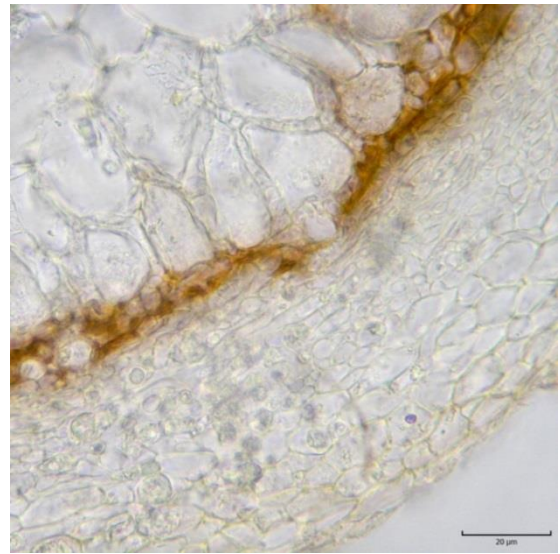
Obr. 11: *Lactarius blennius*



Obr. 12: *Lactarius blennius* příčný řez ECM špičkou



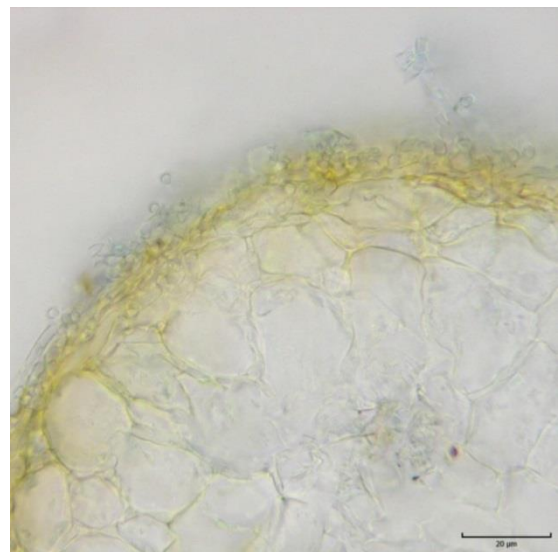
Obr. 13: *Lactarius subdulcis*



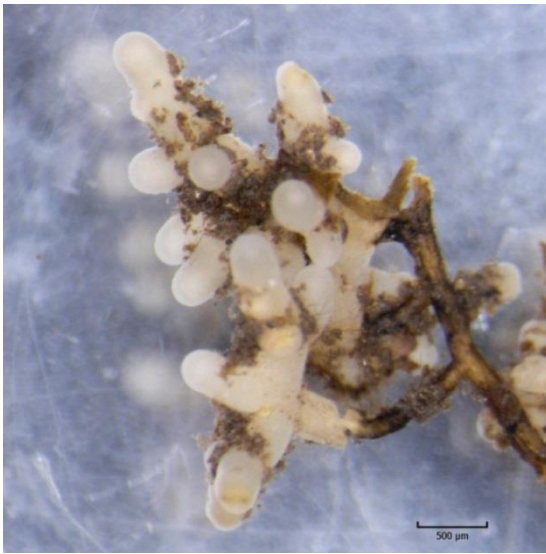
Obr. 14: *Lactarius subdulcis* příčný řez ECM špičkou



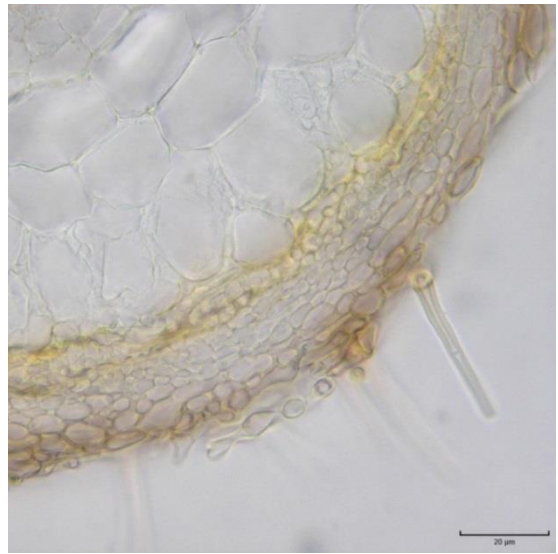
Obr. 15: *Otidea onotica*



Obr. 16: *Otidea onotica* příčný řez ECM špičkou



Obr. 17: *Russula mairei*



Obr. 18: *Russula mairei* příčný řez ECM špičkou



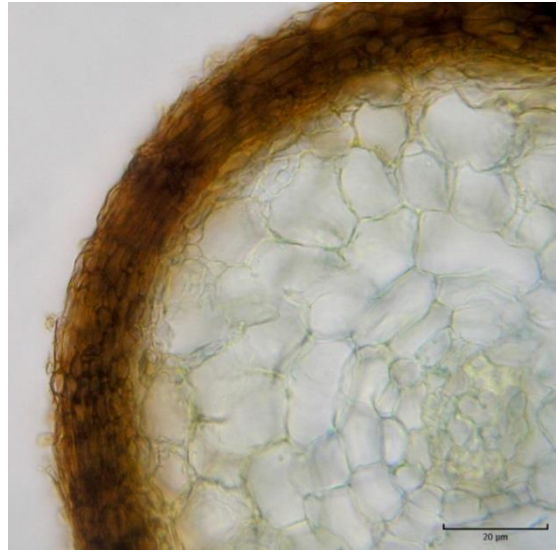
Obr. 19: *Russula nigricans*



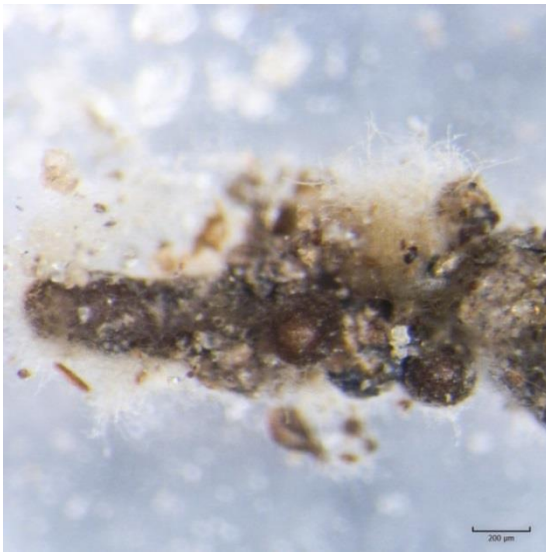
Obr. 20: *Russula nigricans* příčný řez ECM špičkou



Obr. 21: *Tomentella ferruginea*



Obr. 22: *Tomentella ferruginea* příčný řez ECM špičkou



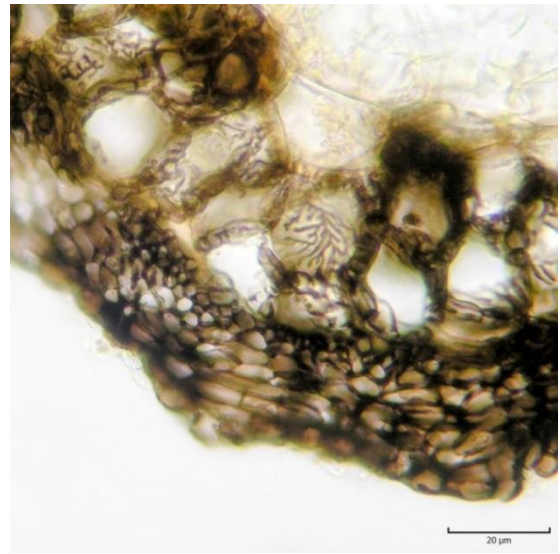
Obr. 23: *Tomentella cf. lilacinogrisea*



Obr. 24: *Tomentella cf. lilacinogrisea* příčný řez ECM špičkou



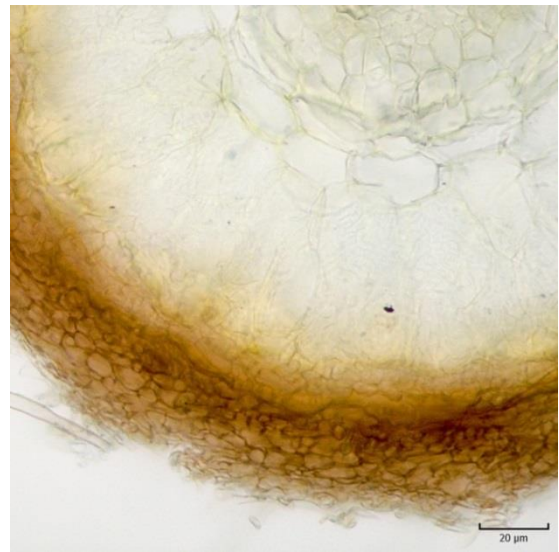
Obr. 25: *Tomentella* sp.



Obr. 26: *Tomentella* sp. příčný řez ECM špičkou



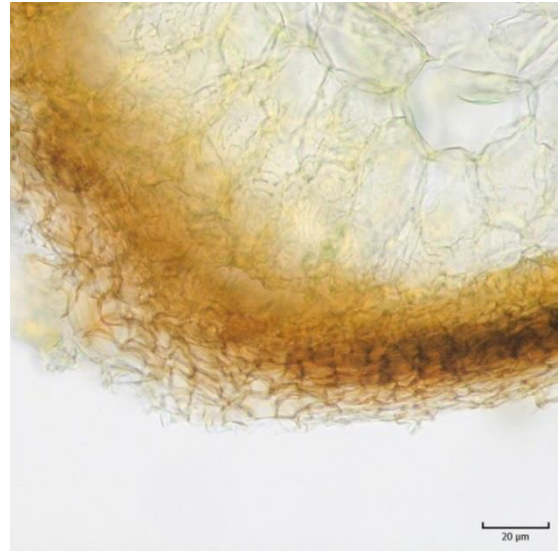
Obr. 27: *Tomentella* cf. *sublilacina*



Obr. 28: *Tomentella* cf. *sublilacina* příčný řez ECM špičkou



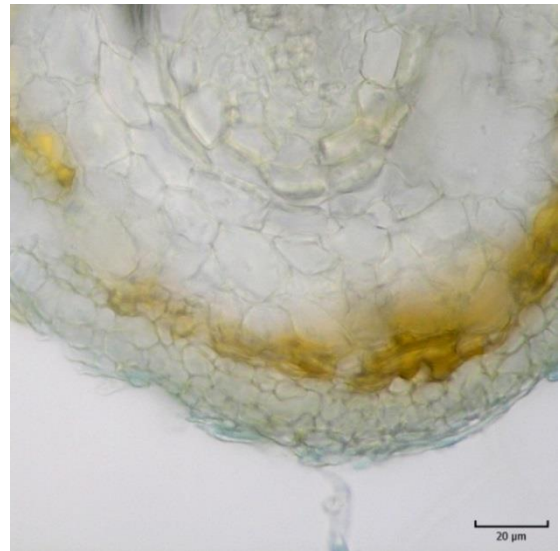
Obr. 29: *Tomentella sublilacina*



Obr. 30: *Tomentella sublilacina* příčný řez ECM špičkou



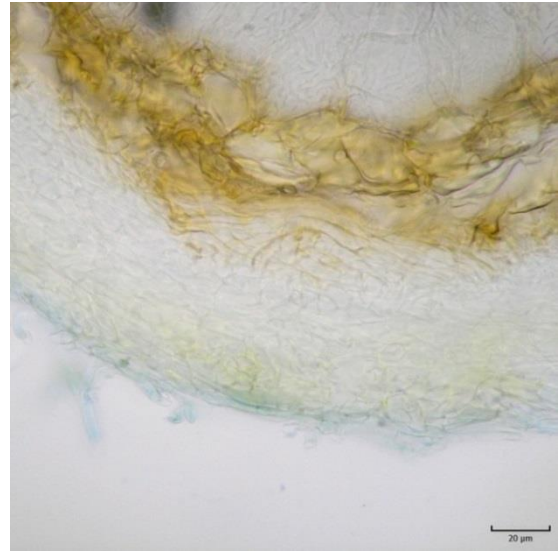
Obr. 31: *Tuber annae*



Obr. 32: *Tuber annae* příčný řez ECM špičkou



Obr. 33: *Xerocomus pruinatus*



Obr. 34: *Xerocomus pruinatus* příčný řez ECM špičkou