

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika



Bc. Tereza Konvalinková

**INTERAKCE MIKROSKOPICKÝCH HUB A KRYTENEK
V OPADU SMRKU ZTEPILÉHO**

**INTERACTIONS OF MICROSCOPIC FUNGI AND TESTATE
AMOEBAE IN NORWAY SPRUCE LITTER**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. května 2011

.....

Tereza Konvalinková

PODĚKOVÁNÍ

Předkládaná práce by nikdy nevznikla bez pomoci celé řady lidí, kteří se tak či onak podíleli na jejím zrodu, průběhu i dokončení.

V první řadě chci poděkovat svému školiteli Mgr. Ondřejovi Koukolovi, Ph.D. z Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, za jeho laskavé i přísné odborné vedení, ale i za vlídné přátelství a pevné povzbuzování, když jsem klesala na mysl.

Též bych chtěla vyjádřit vděčnost svým dvěma konzultantům. Mgr. Zuzana Burdíková z Oddělení biomatematiky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR mě zasvětila do světa krytenek; bez jejích odborných znalostí, ale i elánu a vytrvalého nadšení by realizace této práce byla jen těžko myslitelná. RNDr. Martin Vohník, Ph.D. z Oddělení mykorhizních symbióz Botanického ústavu Akademie věd ČR stál u zrodu této práce a poskytl mi cenné nápady, a také mu vděčím za přístup do Optické laboratoře.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Macháčovi z Optické laboratoře Botanického ústavu Akademie věd ČR, který mě zasvětil do tajů elektronové mikroskopie, doc. Zuzaně Münzbergové, Ph.D., která nad rámec běžné výuky usměrnila mé tápání na poli mnohorozměrných statistických metod, a Mgr. Ivaně Markové ze Správy Národního parku České Švýcarsko, jež zrealizovala odběr vzorků v této lokalitě.

Rovněž chci poděkovat svým kolegyním a kamarádkám z mykologické laboratoře Katedry botaniky, Bc. Kristýně Černé a Bc. Zuzaně Kolářové, za technické rady i všelickou výpomoc, ale především za dobrou náladu, již v laborce vytrvale šířily.

V neposlední řadě patří můj velký dík mé rodině, mému příteli, mým přátelům, pedagogům i spolužákům, zkrátka všem, kteří mi na nesnadné cestě za poznáním pomáhali radou či úsměvem.

OBSAH

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. ÚVOD	8
3.1. Houby v půdě a opadu jehličnatých lesů	8
3.1.1. Interakce hub s jinými organismy v půdě a experimentálních systémech	9
3.2. Krytenky	11
3.2.1. Krytenky půdě a rostlinném opadu	15
3.2.2. Krytenky a houby	17
3.3. Cíle a struktura práce	19
4. METODIKA	20
4.1. Lokality, odběr vzorků	20
4.2. Kultivace ve vlhkých komůrkách	21
4.3. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie	22
4.4. Kultivace krytenek	22
4.4.1. Kultivace druhu <i>Arcella discoides</i> Ehrenberg, 1843	22
4.4.2. Odolnost krytenky <i>A. discoides</i> vůči antibiotikům	23
4.4.3. Kultivace druhu <i>Phryganella acropodia</i> (Hertwig et Lesser, 1874) Hopkinson, 1909	23
4.5. Kultivace krytenky <i>A. discoides</i> s živým a mrtvým myceliem	24
4.6. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů	25
4.7. Statistické vyhodnocení	26
4.7.1. Analýza dat o druzích hub z jehlic kultivovaných ve vlhkých komůrkách	26
4.7.2. Analýza dat o krytenkách z jehlic kultivovaných ve vlhkých komůrkách	26
4.7.3. Analýza dat získaných pozorováním jehlic v elektronovém mikroskopu	27
4.7.4. Analýza dat o krytence <i>A. discoides</i> kultivované s živým a mrtvým myceliem	28
4.7.5. Analýza dat získaných kultivací jehlic s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů	28
4.8. Seznam zkratk	29
5. VÝSLEDKY	30
5.1. Houby v opadu tří druhů jehličnanů	30
5.2. Krytenky v opadu tří druhů jehličnanů	32
5.3. Společenstvo krytenek na smrkových jehlicích	34
5.4. Kultivace krytenek	37
5.5. Odolnost krytenky <i>A. discoides</i> vůči antibiotikům	37
5.6. Kultivace krytenky <i>A. discoides</i> s živým a mrtvým myceliem	38
5.7. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů	39
6. DISKUSE	40
6.1. Použitá metodika	40
6.2. Houby v opadu tří druhů jehličnanů	42
6.3. Společenstvo krytenek na smrkových jehlicích	43
6.4. Krytenky v opadu tří druhů jehličnanů	44
6.5. Kultivace krytenky <i>A. discoides</i> s živým a mrtvým myceliem	47
6.6. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů	48
6.7. Vztah krytenek a hub v opadu – souhrnná diskuse	48
7. ZÁVĚR	50
8. LITERATURA	51

9. PŘÍLOHY – PRIMÁRNÍ DATA	57
9.1. Houby a krytenky na jehlicích kultivovaných ve vlhkých komůrkách.....	57
9.2. Krytenky na jehlicích smrku ztepilého pozorovaných ve skenovacím elektronovém mikroskopu ----	64
9.3. Odolnost krytenky <i>A. discoides</i> vůči antibiotikům	65
9.4. Kultivace krytenky <i>A. discoides</i> s živým a mrtvým myceliem.....	65
9.5. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů.....	66

1. ABSTRAKT

Krytenky i houby jsou běžnými obyvateli opadu jehličnanů. Jejich interakce v tomto prostředí byly studovány jen zřídka, ačkoliv tyto organismy dosahují vysoké biologické rozmanitosti a mohou hrát významnou roli v koloběhu živin v tomto prostředí. Ve své práci jsem ke studiu interakcí hub a krytenek použila kultivaci jehlic z opadu ve vlhkých komůrkách. Pro lepší charakterizaci společenstva krytenek přímo na jehlicích jsem použila environmentální skenovací elektronový mikroskop. Pro studium podstaty interakcí jsem dále uskutečnila dva experimenty modifikující biotické podmínky v mikrokosmu.

Tři druhy krytenek z jehlic z opadu byly schopny kolonizovat filtrační papír na dně vlhkých komůrek. Výskyt druhů *Phryganella acropodia* a *Assulina muscorum* na filtračním papíře byl signifikantně podpořen přítomností mycelia. Ve vlhkých komůrkách byl druh *Assulina muscorum* asociován se sporamai hub a druh *Arcella discoidea* byl atrahován sporujícími koloniemi rodu *Cladosporium*. Oproti tomu nebyla pozorována asociace putativně mykofágního druhu *Phryganella acropodia* se sporamai hub. V dalším experimentu byla krytenka *Arcella discoidea* atrahována jak živým, tak mrtvým myceliem. Přitažlivost živého mycelia přitom byla průkazně vyšší a atraktivita mycelia tří druhů hub se průkazně lišila. Na druhou stranu na jehlicích nebyl nalezen vliv mycelia na strukturu společenstva krytenek ani na jejich rozmístění. Uvedené experimenty mě vedly k následujícím závěrům: I) Krytenky se v opadu jehličnanů živí sporamai hub a mikroorganismy asociovanými s myceliem saprotrofních hub. II) Kolonizace substrátu myceliem saprotrofních hub podporuje distribuci krytenek. III) Atrakce krytenek k myceliu může být zprostředkována myceliálními exsudáty.

Klíčová slova: krytenky, saprotrofní houby, opad jehličnanů, vlhké komůrky, environmentální skenovací elektronová mikroskopie, *Arcella discoidea*, *Phryganella acropodia*, *Assulina muscorum*, trofické interakce, mykofagie, myceliální exsudáty.

2. ABSTRACT

Both testate amoebae and fungi are common inhabitants of coniferous litter. Their interactions in this environment were rarely studied, although they reach high biodiversity and can play a significant role in nutrient cycling in this environment. In this study, a cultivation of litter needles in the damp chambers was used to investigate interactions between fungi and testate amoebae. Observation of spruce litter needles in environmental scanning electron microscope was used to better characterize testate amoebae communities directly on the needles. Additionally, two experiments changing the biotic conditions in the microcosm were used to follow a principle of the interactions.

Three species of testate amoebae from litter needles were able to colonize the filter paper on the bottom of the damp chambers. Occurrence of *Phryganella acropodia* and *Assulina muscorum* on the filter paper was significantly fuelled by the presence of mycelium. *Assulina muscorum* was associated with the fungal spores and *Arcella discooides* was attracted by sporulating colonies of *Cladosporium* spp. in the damp chambers. By contrast, no association of putatively mycophagous *Phryganella acropodia* with fungal spores was observed. *Arcella discooides* was attracted both by live and death mycelium in additional experiment. Interestingly, the attractive force of living mycelium was significantly higher and the appeal of mycelium of three species of fungi was significantly distinct. On the other hand, no influence of mycelium on structure of testate amoebae community and their space distribution was found on the needles. Aforesaid experiments led me to following conclusions: I) Testate amoebae in coniferous litter feed on fungal spores and microorganisms associated with mycelium of saprotrophic fungi. II) The colonization of substrate by mycelium of saprotrophic fungi facilitates the distribution of testate amoebae. III) Attraction of testate amoebae to the mycelium may be driven by production of mycelial exudates.

Keywords: testate amoebae, saprotrophic fungi, coniferous litter needles, damp chambers, environmental scanning electron microscopy, *Arcella discooides*, *Phryganella acropodia*, *Assulina muscorum*, trophic interactions, mycophagy, mycelial exudates.

3. ÚVOD

Opad jehličnatých dřevin vytváří na zemském povrchu svérázné prostředí, v němž se za rozličných situací střetávají nejrůznější skupiny organismů. Některým z nich je vědeckou obcí věnována pečlivá pozornost. To je případ hub, jejichž klíčová role v dekompozici organické hmoty a v koloběhu živin je stále předmětem výzkumu, neboť nové poznatky kladou před mykology další a další otázky. Jiné organismy bývají naopak při studiu opadu jehličnanů spíše opomíjeny. To se týká i krytenek, ačkoliv se v tomto prostředí zcela běžně vyskytují. Jejich role v koloběhu živin a zejména jejich vztahy s ostatními organismy nám však stále unikají.

Krytenky se na jehlicích nezbytně setkávají se saprotrofními houbami; lze tedy předpokládat, že mezi těmito organismy dochází k rozmanitým interakcím. Ve své práci jsem se snažila alespoň část ze vztahů krytenek a hub v opadu jehličnanů poodhalit.

3.1. Houby v půdě a opadu jehličnatých lesů

Houby jsou významnou součástí společenstva organismů v organickém půdním nadloží (tj. opadovém, fermentačním a humusovém horizontu) i v horních vrstvách mineralizované půdy jehličnatých lesů. Například biomasa hub v nadložní vrstvě čtyř evropských smrkových lesů dosahovala 1–5 kg C/ha, což činilo 79–91 % celkové hmoty mikro- a mesoorganismů (Schröter 2001).

Zatímco biomasu hub v půdě či opadu můžeme dobře stanovit podle množství ergosterolu v prostředí nebo analýzou fosfolipidických mastných kyselin (PLFA), jejich druhová diverzita je nám mnohem hůře dostupná (Cairney 2005). Přímé pozorování či kultivační techniky totiž zachytí jen část přítomných druhů v porovnání s molekulárními technikami založenými na extrakci DNA přímo z půdy či opadu (Cairney 2005, Seifert 2008, Kolářová 2009), avšak ani tyto metody nám zatím neposkytnou úplnou informaci o přítomných druzích, mimo jiné i z důvodu nedostatku kvalitně taxonomicky ošetřených referenčních sekvencí DNA dostupných v databázích (Nilsson *et al.* 2006, Seifert 2008, Crous *et Robert* 2008). Kombinace studií založených na přímém pozorování, kultivaci i molekulárních datech poskytuje poměrně jasnou představu o průběhu kolonizace a dekompozice odumřelých jehlic houbami:

První skupinou hub, účastníci se rozkladu jehlic, jsou původně epifytní, endofytní i parazitické houby (např. *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. a *Lophodermium* spp.), které zahajují dekompozici již během senescence jehlic na stromě (Tokumasu *et* Aoiki 2002, Lindahl *et al.* 2007, Korkama-Rajala *et al.* 2008, Lindahl *et* Boberg 2008, Przybył *et al.* 2008). Po dopadu jehlice na zem je nejdříve houbami rozložen vnitřní obsah buněk, později dochází k rozkladu celulózy a ligninu. Těchto prvních stádií se účastní saprotrofními vřeckovýtrusé i stopkovýtrusé houby, např. *Desmazierella acicola* (nalézána jako anamorfa *Verticicladium trifidum*), *Marasmius androsaceus* a *Mycena* spp. (Ponge 1991, Tokumasu *et al.* 1994, Tokumasu *et* Aioiki 2002, Lindahl *et al.* 2007, Lindahl *et* Boberg 2008, Boberg 2009). Po několika letech od odumření jehlice, ve fermentační a humusové vrstvě, jsou

saprotrofní druhy nahrazeny ektomykorhizními (případně i erikoidně mykorhizními) houbami (Ponge 1991, Lindahl *et al.* 2007, Lindahl *et al.* 2008).

Znalost taxonomické a funkční diverzity hub při dekompozici je klíčová pro porozumění koloběhu živin v ekosystémech (Lindahl *et al.* 2002). V jehličnatých lesích jsou houby spolu s bakteriemi hlavními rozkladači opadu (Schröter 2001, Lindahl *et al.* 2002, Lindahl *et al.* 2007, Boberg 2009), přičemž podíl hub na dekompozici je vyšší v boreálních nežli teplejších oblastech (Schröter 2001, Lindahl *et al.* 2002). Význam hub v lesních (i jiných) ekosystémech tkví zejména v jejich schopnosti degradovat prostřednictvím extracelulárních enzymů těžko rozložitelné látky – celulózu a lignin (Burke *et al.* 2002, Osono *et al.* 2003, Baldrian 2006, Osono 2007), ale i humusové sloučeniny (Steffen *et al.* 2002, Koukol *et al.* 2004, Baldrian 2006, Grihut *et al.* 2007). Jednotlivé prvky mohou být buď ukládány do biomasy hub (proces imobilizace), nebo uvolňovány do prostředí ve formě anorganických sloučenin, dostupných rostlinám (proces mineralizace). Příspěvek hub k mineralizaci uhlíku v jehličnatých lesích je značný, např. ve čtyřech evropských smrkových lesích prodýchaly houby ročně přibližně 500–1300 kg C/ha, což činilo asi 45–65 % uhlíku mineralizovaného půdními mikro- a mesoorganismy (Schröter 2001). Co se týče mineralizace dusíku, je situace poněkud složitější. Obecný model, platný například v travních ekosystémech, předpokládá, že protože se při rozkladu rostlinné hmoty zmenšuje poměr uhlíku k dusíku, houby v pokročilejších stádiích rozkladu nejsou schopny zabudovat veškerý dostupný dusík do své biomasy a tak dochází k jeho mineralizaci (Lindahl *et al.* 2002). Ovšem v jehličnatých lesích je substrát v pokročilejším stadiu rozkladu kolonizován převážně houbami, jejichž stélka tvoří rozsáhlou myceliální či rhizomorfní síť, v níž dochází k translokaci živin (Lindahl *et al.* 2002, Cairney 2005, Lindahl *et al.* 2008, Boberg 2009). Saprotrofní houby tak vyvažují nedostatek uhlíku v rozloženějších substrátech přesunem uhlíkatých sloučenin z čerstvějšího opadu a mykorhizní houby, převládající v posledních stádiích dekompozice, přesouvají nadbytečný dusík do hostitelských rostlin; k mineralizaci dusíku tak v jehličnatých (a zejména boreálních) lesích pravděpodobně téměř nedochází (Lindahl *et al.* 2002, Lindahl *et al.* 2008, Boberg 2009). Mykorhizní houby také tímto způsobem významně přispívají k fixaci uhlíku z atmosféry, neboť růst a fotosyntetická aktivita rostlin jsou v jehličnatých lesích často omezeny právě dostupností dusíku (Lindahl *et al.* 2002).

3.1.1. Interakce hub s jinými organismy v půdě a experimentálních systémech

Je zřejmé, že interakce rostlin s mykorhizními, ale i saprotrofními houbami hraje klíčovou roli v ekologii lesních půd. Rostliny však zdaleka nejsou jedinými organismy, které houby v půdě ovlivňují.

Půdní houby například na jednu stranu soupeří s bakteriemi o jednoduše rozložitelné zdroje uhlíku, na druhou stranu houby poskytují bakteriím jako zdroj potravy myceliální exsudáty a produkty rozkladu rostlinné hmoty (de Boer *et al.* 2005). Timonen *et al.* (1998) v experimentálním systému se semenáčky borovice lesní (*Pinus sylvestris*), inokulovanými ektomykorhizními houbami čechratkou

podvinutou (*Paxillus involutus*) a klouzkem kravským (*Suillus bovinus*), zjistili, že společenstva bakterií v mykorhizosféře a v houbami neosídlené půdě se liší ve schopnosti využívat různé zdroje uhlíku: zatímco prvé preferují uhlovodíky, spjaté s kořenovými a myceliálními exsudáty, druhé preferují organické kyseliny a aminokyseliny, spjaté s mikrobiální dekompozicí. Podobný vzorec ve využívání různých zdrojů uhlíku byl nalezen i u bakterií obývajících rhizosféru semenáčků dalších mykorhizních hub (Heinonsalo *et al.* 2001). Dokonce i bakterie osidlující mykorhizosféru různých druhů hub se liší ve schopnosti využívat různé zdroje uhlíku, v závislosti na složení myceliálních exsudátů daného druhu houby (Timonen *et al.* 1998). Nemykorhizní kořeny také hostí větší množství bakterií nežli kořeny mykorhizní, pravděpodobně proto, že mykorhizace snižuje množství kořenových exsudátů (Timonen *et al.* 1998, Bonkowski *et al.* 2001). Půdní houby nicméně mohou ovlivňovat společenstva bakterií nejen podle toho, jaké zdroje jim poskytují, ale i vylučováním antibiotik do prostředí (de Boer *et al.* 2005).

Houby výrazně působí i na společenstva půdních prvoků – améby, nálevníky a bičíkovce. Například améby rodu *Acanthamoeba* byly nalezeny v několikanásobně větší hustotě v půdě v těsné blízkosti plodnic lakovky druhu *Laccaria trullisata* nežli v okolní půdě (Napolitano *et al.* 1981). Ingham *et al.* (1994) odhalili v experimentálních systémech s jehličnany inokulovanými ektomykorhizními houbami (zejména různými druhy rodu *Rhizopogon*) kvalitativně i kvantitativně odlišná společenstva prvoků v závislosti na druhu houby; význam vlivu houby dokresluje také skutečnost, že rozdílné druhy jehličnanů hostily podobná společenstva prvoků, pakliže byly v symbióze se stejným druhem houby. V okolí mykorhizních kořenů se přitom vyskytovalo větší množství prvoků, nežli v okolí kořenů holých (Ingham *et al.* 1994). Také Jentschke *et al.* (1995) zjistili v podobném pokusu pozitivní vliv mykorhizní kolonizace kořenů ryzcem ryšavým (*Lactarius rufus*) na četnosti améb, bičíkovci však zůstali mykorhizou nedotčeni. Naopak Timonen *et al.* (2004) našli v experimentu s klouzkem kravským (*S. bovinus*) a čechratkou podvinutou (*P. involutus*) větší masu améb a bičíkovců na kořenech holých nežli mykorhizních. Houby přitom mohou ovlivňovat společenstva půdních prvoků jak přímo – uvolňováním myceliálních exsudátů, tak zprostředkovaně – působením na množství i strukturu společenstva bakterií (Napolitano *et al.* 1981, Ingham *et al.* 1994, Timonen *et al.* 2004).

Nicméně i sami prvoci mohou ovlivňovat půdní houby. Například améby rodu *Acanthamoeba* redukovaly délku hyf čechratky podvinuté (*P. involutus*) v rhizosféře smrku – aniž by tím však utrpěla hostitelská rostlina (Bonkowski *et al.* 2001); mykofágní améby *Saccamoeba* sp. a *Gephyramoeba* sp. působily negativně na kolonizaci borových kořenů kořenovcem žlutavým (*Rhizopogon luteolus*) (Chakraborty *et al.* 1985). Tytéž améby, stejně jako druh *Thecamoeba granifera*, také v biologickém testu potlačovaly rozvoj černání pat stébel pšenice, způsobené houbou *Gaeumanomyces graminis tritici* (Chakraborty 1983).

Rovněž drobní členovci, jako jsou chvostoskoci a pancířníci, interagují v lesní půdě s mykorhizními i saprotrofními houbami. Tyto organismy přenáší na svém povrchu i v trávicím traktu

spory hub, čímž přispívají k jejich šíření – ačkoliv se totiž pohybují relativně pomalu (v řádu centimetrů za den), v heterogenním prostředí, jako je půda, může být i krátký přesun správným směrem (například na nový kvalitní substrát) pro houby významný (Renker *et al* 2005). Chvostokoci a pancířníci konzumují selektivně mycelium i spory různých druhů hub, nelze však jednoznačně říci, že by preferovali houby vřeckovýtrusé či stopkovýtrusé, mykorhizní či saprotrofní, melanizované či hyalinní – jednotlivé druhy těchto členovců se totiž ve svých preferencích liší, což patrně snižuje jejich vzájemnou kompetici (Klironomos 1992, Schneider *et al* 2005, Schneider *et al.* 2005, Koukol *et al.* 2009). Preferované houby jsou chvostokoky vyhledávány podle těkavých látek, uvolňovaných myceliem (Bengtsson *et al.* 1988). Selektce určitých druhů hub chvostokoky může urychlovat sukcesi hub na jehlicích (Klironomos 1992). Konzumace mycelia chvostokoky také může změnit morfologii a způsob růstu poškozovaných hub. Třepeňka svazčitá (*Hypholoma fasciculare*) například ve snaze uniknout svým konzumentům přecházela od difúzního způsobu růstu s hustou sítí jemného mycelia ke zvýšené tvorbě myceliálních provazců, často expandujícím do prostředí – takové změny v morfologii a rozsahu mycelia u hub schopných translokace živin mohou mít významný vliv i na koloběh prvků v prostředí (Kampichler *et al.* 2004).

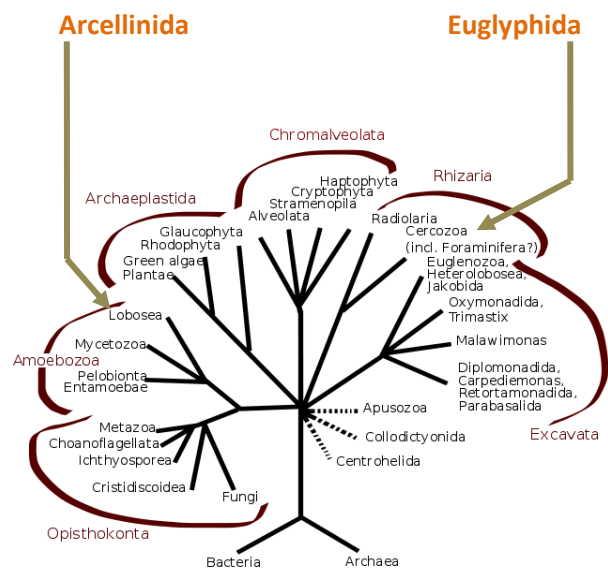
3.2. Krytenky

Krytenky („*testate amoebae*“) jsou jednobuněčné organismy vyznačující se panožkami (pseudopodiemi), schránkou (testou), která má pouze jeden otvor, jímž jsou panožky vysouvány, a dále heterotrofní, vzácněji mixotrofní výživou. V průběhu tří století (Obr. 1) bylo objeveno okolo 2 000 druhů krytenek (Smith *et al.* 2008). Toto číslo ovšem není konečné, recentní studie například odhalují existenci kryptických a pseudokryptických druhů (Lara *et al.* 2009, Heger *et al.* 2011).

Krytenky jsou skupinou organismů vymezenou morfologicky a ekologicky, nikoliv fylogeneticky (Obr. 2). Nejvýznamnější taxonomickou skupinou, označovanou jako krytenky, je řád Arcellinida Kent, 1880, k němuž náleží tři čtvrtiny známých druhů krytenek (Meisterfeld *et al* 2008a). Molekulární studie zařadily tento řád mezi Amoebozoa, do skupiny Tubulinea, tedy do příbuzenstva „nahých“ améb (Smirnov *et al.* 2005, Nikolaev *et al.* 2005, Lara *et al.* 2008, Tekle *et al.* 2008). Druhou významnou skupinou krytenek je řád Euglyphida Copeland, 1956 emend. Cavalier-Smith, 1997, náležející ve skupině Rhizaria mezi Cercozoa (Wylezich *et al.* 2002, Nikolaev *et al.* 2004, Bass *et al.* 2005, Lara *et al.* 2007). Protože většina prací o krytenkách pojednává právě o těchto dvou řádech, zaměřila jsem na ně úvod své práce. Organismy spadající do výše uvedené definice krytenek ovšem nalézáme i v dalších řádech eukaryotních organismů, například čeleď Pseudodiffugiidae De Saedeleer, 1934 řádu Tectofilosida (Cavalier-Smith *et al* 2003, Bass *et al.* 2005).

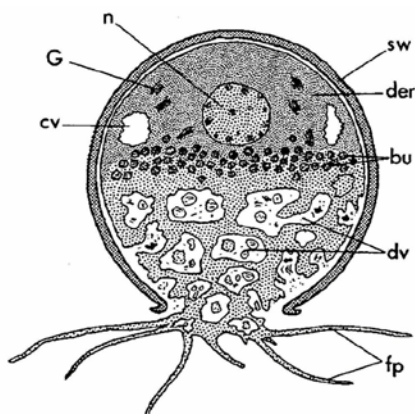


Obr. 1: *Arcella vulgaris*, historická ilustrace Josepha Leidyho (1879)



Obr. 2: Postavení krytenek ve zjednodušeném „stromě života“ – Převzato ze Simpson et Roger 2004.

Vnitřní stavba buňky obou hlavních řádů krytenek je velice podobná: anteriorní část buňky (poblíž pseudostomatu) obsahuje světlejší cytoplasmu s množstvím potravních vakuol; v tmavší posteriorní části se nachází jádro (vzácně i dvě a více), endoplazmatické retikulum, jeden či více diktyosomů, mitochondrie a periferně umístěné stažitelné vakuoly (Hedley *et* Ogden 1973, Ogden *et* Pitta 1990). Ačkoliv je potrava fagocytována výhradně v oblasti pseudostomatu, v buňce není vytvořeno cytostoma či cytoporus (Gilbert *et al.* 2000). Řády Euglyphida a Arcellinida se liší stavbou panožek: zatímco u zástupců řádu Euglyphida nalézáme výhradně tenká hyalinní filopodia, zástupci řádu Arcellinida tvoří široká (endo)lobopodia, tedy panožky obsahující kromě hyalinní ektoplazmy též zrnitou endoplazmu; v některých případech však mohou tyto panožky přecházet v anastomózuující hyalinní retikulolobopodia, někdy také nazývaná filopodia (Hedley *et* Ogden 1973, Hausmann *et* Hülsmann 1985, Ogden *et* Pitta 1990, Meisterfeld *et* Mitchell 2008a).



Obr. 3: Vnitřní stavba buňky krytenky (*Phryganella acropodia*):

Potravní vakuoly (dv) se nachází v blízkosti pseudostomatu, z něj vybíhají panožky (fp), zatímco jádro (n), Golgiho aparát (G), stažitelné vakuoly (cv) a mitochondrie jsou umístěny v posteriorní části buňky, vyplněné hrubým endoplazmatickým retikulem (der). Dále se v buňce nachází membránové váčky se stavebními jednotkami (bu), z nichž vzniká kostra organické části schránky (sw). Převzato z Ogden *et* Pitta (1990).

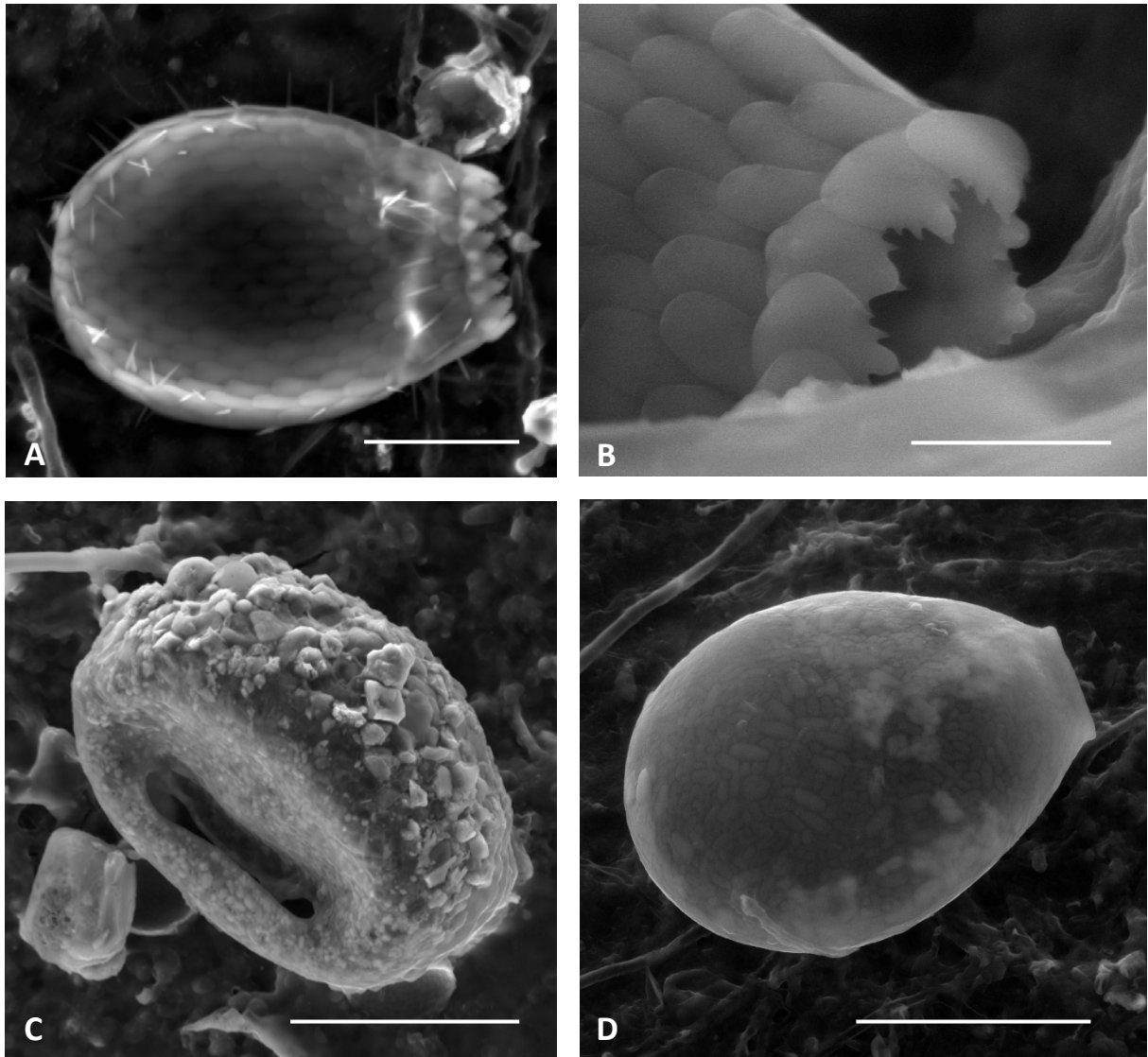
Schránky krytenek jsou rozmanité co do velikosti, tvaru i složení. Protože vymezení většiny rodů a druhů je podepřeno právě znaky schránky, lze určovat jak živé, tak mrtvé (dokonce i fosilizované) jedince, což mimo jiné umožňuje studovat krytenky v přírodních vzorcích bez předchozí kultivace. Zatímco nejmenší krytenky, jako např. *Diffflugia minutissima*, dosahují velikosti okolo 10 μm (Clarke 2003), největší zástupci téhož rodu mohou být i větší než 500 μm (Meisterfeld *et al.* 2008b).

Krytenky řádu Euglyphida mají schránky tvořené křemičitými šupinami (idiosomy), spojenými organickým tmelem. Idiosomy jsou obvykle pravidelně uspořádané (Obr. 4A), přičemž šupiny obklopující pseudostoma se mnohdy liší od tělních šupin velikostí i tvarem (typické jsou výrazné zuby u rodu *Euglypha*, Obr. 4B). Někdy mohou být průsvitné křemičité idiosomy navíc potaženy pigmentovanou organickou vrstvou, jako je tomu u rodu *Assulina* (Mitchell *et al.* 2008).

U řádu Arcellinida nalézáme ve stavbě schránky větší rozmanitost: schránky jsou buď proteinové (např. rody *Arcella*, *Hyalosphenia*), nebo aglutinátní – do organického pojiva jsou zabudovávány tzv. xenosomy, původně pohlcená minerální zrna (např. rody *Phryganella*, *Buillinularia*, Obr. 4C) nebo částčky detritu či kořisti (např. schránky rozsivek nebo šupiny krytenek řádu Euglyphida, jako je tomu u rodu *Nebela*, Obr. 4D); vzácněji mohou být schránky pokryty idiosomy – křemičitými či vápenatými destičkami vlastní výroby (Mitchell *et al.* 2008, Meisterfeld *et al.* 2008a).

Krytenky se rozmnožují převážně nepohlavně, přičemž buněčnému dělení předchází syntéza schránky pro dceřiného jedince; tvorba schránky a rozdělení buňky trvá přibližně 1-3 hodiny (Hedley *et al.* 1973, Netzel 1976, 1979). Nově vzniklé schránky řádu Arcellinida jsou světlé, a teprve v průběhu dalšího života u některých druhů tmavnou v důsledku ukládání železa či manganu (Hedley *et al.* 1976, Ogden *et al.* 1989).

Ke svému životu potřebují krytenky vodní prostředí. Některé druhy žijí v mořích (Heger *et al.* 2010), většina krytenek však obývá sladkovodní či terestrické biotopy, hojně je nalézáme například v rašeliništích, půdě či opadu. K přežití v prostředí s nestálým obsahem vody slouží krytenkám schopnost encystace, tj. tvorby cyst uvnitř schránek, kdy se krytenka oddělí od okolí více či méně robustní přepážkou. Předpokládá se, že krytenky vznikly v sladkovodním prostředí, přičemž evolučně původním znakem schránky je koncové postavení pseudostomatu (např. rody *Euglypha*, *Nebela*), zatímco ventrální umístění otvoru (např. rody *Corythion*, *Arcella*) je znakem odvozeným, neboť umožňuje krytenkám těsněji přilnout otvorem k podkladu; díky němu se také mohou i větší druhy krytenek pohybovat v tenkém vodním filmu, tvořícím se v terestrických biotopech, například na povrchu jednotlivých kusů opadu. Tuto domněnku podporují fylogenetické studie jak pro řád Euglyphida (Lara *et al.* 2007), tak pro řád Arcellinida (Nikolaev *et al.* 2005, Lara *et al.* 2008).



Obr. 4: Různé typy stavby schránky krytenek.

A, B: *Euglypha strigosa* – schránka s křemičitými šupinami a ostny. A: Měřítko 25 µm. B: Šupiny obklopující pseudostoma. Měřítko 10 µm.

C: *Buillinularia indica*. – aglutinátní stavba schránky, xenosomy jsou minerální částice; ventrální, zanořená pseudostoma. Měřítko 100 µm.

D: *Nebela tincta*. – aglutinátní stavba schránky, xenosomy jsou šupiny kořisti – menších krytenek z řádu Euglyphida; terminální pseudostoma. Měřítko 50 µm.

Jako skupina jsou krytenky celosvětově rozšířené. Některé druhy jsou kosmopolitní, rozšíření jiných druhů je geograficky omezeno. Nejznámějším takovým případem je *Apodera vas*, běžně nalézaná v rašeliništích na jižní polokouli, avšak chybějící v Evropě a Severní Americe (Mitchell *et* Meisterfeld 2005). Omezené rozšíření některých druhů krytenek, narušující hypotézu celosvětového rozšíření volně žijících prvoků, je nicméně předmětem diskuse (Finley *et al.* 2004, Mitchell *et* Meisterfeld 2005, Foissner 2006, Lara *et al.* 2008, Smith *et al.* 2008, Wilkinson 2009). Některé studie krytenek obývajících lesní půdy nicméně ukazují, že na úrovni státu (Todorov 2001) či kontinentu (Schröter 2001) jsou společenstva krytenek ve stejných habitatech značně uniformní.

Potrava krytenek je velice rozmanitá. Menší druhy (přibližně do 70 μm) jsou spíše detritovorní či bakteriovorní, případně konzumují spory hub, větší druhy jsou ovšem také predátory prvoků (zejména rozsivek aj. jednobuněčných řas, nálevníků a krytenek), ale i menších zástupců mnohobuněčných živočichů, např. hlístic či vířníků (Yates *et Foissner* 1995, Gilbert *et al.* 2000, 2003, Schröter 2001). Rozdíly ve výživě můžeme nalézt i v rámci jednoho druhu: například zatímco menší zástupci druhu *Trinema enchelys* konzumují pouze bakterie a detritus, větší se živí také jinými krytenkami (Laminger 1978). Svou potravu pohlcují krytenky fagocytózou, některé však dokážou konzumovat organismy větší než ony samy – buď si kořist posouvají do pseudostomatu a postupně ji rozkládají, nebo penetrují její buněčnou stěnu či schránku (Hoogenraad *et de Groot* 1941, Yates *et Foissner* 1995, Gilbert *et al.* 2000). V některých případech vyhledávají krytenky svou kořist chemotakticky, jindy je patrně k jejímu nalezení zapotřebí přímý kontakt (Gilbert *et al.* 2000). Protože se krytenky oproti jiným jednobuněčným organismům pohybují relativně pomalu, je jejich predační chování ovlivněno množstvím vody v prostředí; např. krytenka komplexu *Nebela tincta major-bohemica-colaris* v rašeliništi obvykle konzumuje převážně řasy a houby, avšak v sušších letních měsících, kdy tenčí vrstva vodního filmu zpomaluje a koncentruje jednobuněčné organismy, loví tato krytenka i heterotrofní prvoky a mnohobuněčné živočichy (Gilbert *et al.* 2003). Naopak Laminger (1978) pozoroval u druhu *Trinema enchelys* v půdě subalpínské louky zdánlivě opačný trend: v suchých obdobích roku se tato krytenka živila detritem, ale když s rostoucí půdní vlhkostí vzrostla i hustota bakterií a posléze drobných krytenek, konzumovala i tyto organismy. Některé druhy krytenek z vodních biotopů (nejznámější je *Hyalosphaenia papilio*) také využívají ke své výživě endosymbiotických autotrofních řas (Gilbert *et al.* 2000).

3.2.1. Krytenky půdě a rostlinném opadu

Krytenky jsou běžně nalézány v nadložních půdních horizontech i svrchní vrstvě půdy lesních i travních ekosystémů celého světa. Obecně lze říci, že druhové bohatství i četnost krytenek je v půdním nadloží (horizonty L, F, H) větší nežli v povrchovém minerálním horizontu (A), jak dokládají studie z evropských a kanadských listnatých i jehličnatých lesů, vysokohorských pastvin a luk, ale i z tropického horského lesa v Ekvádoru (Lousier 1975, Lousier 1982, Rauenbusch 1987, Krashevskaja *et al.* 2008). Při srovnání jednotlivých nadložních vrstev již nenacházíme tak jasný vzorec: zatímco v bulharských bučinách i německých borech a listnatém lese bylo nalezeno více druhů i jedinců v opadové nežli humusové vrstvě (Rauenbusch 1987, Todorov 2001), kanadští autoři (Lousier 1975, 1982, Lousier *et Parkinson* 1984) naopak našli v rozmanitých biotopech vysokohorského údolí Kananaskis větší druhové bohatství i biomasu krytenek v humusovém a fermentačním nežli opadovém horizontu. Druhy s hruškovitou či ostnitou schránkou se vyskytovaly pouze v opadovém či fermentačním horizontu, s výjimkou druhů s aglutinátní schránkou, jejichž biomasa rostla s hloubkou horizontu, což si autor vysvětluje větší dostupností xenosomů v hlubších partiích (Lousier 1975, 1982). Tento trend je patrný i v práci Rauenbusche (1987). Naopak druh *Corythion dubium*, který se

vyskytuje nejčastěji na čerstvém opadu (Rauenbusch 1987), spolu s několika dalšími půdními druhy krytenek dokonce kolonizuje i spodní části kmenů stromů (Wanner 1991).

Zdá se, že společenstva krytenek vykazují větší rozdíly mezi habitaty, nežli je tomu u ostatních prvoků (Lousier 1975). V listnatých lesích je nalézána větší druhová rozmanitost i biomasa krytenek, nežli v lesích jehličnatých (Schönborn 1975, Rauenbusch 1987, Wanner 1991). Bamforth (1971) však v rozmanitých stanovištích napříč Severní Amerikou zjistil, že zatímco v listnatých biotopech dosahují krytenky stejných nebo menších četností nežli nálevníci, v jehličnatých lesích, kde je pomalejší dekompozice, krytenky svou četností nálevníky řádově převyšují. Autor se domnívá, že právě nižší produktivita těchto půd vyhovuje krytenkám více, nežli ostatním, rychleji rostoucím prvokům.

Krytenky jsou využívány ke sledování stavu půdního prostředí. Například Aescht *et* Foissner (1992) sledovali vliv přihnojení půdy během opětovného zalesňování vysokohorského stanoviště na půdní mikroorganismy. Ačkoliv ošetření půdy organickým hnojivem zvýšilo pH o 0,5 a anorganickým hnojivem dokonce o 2 stupně, nemělo průkazný vliv na strukturu společenstva krytenek. Přitom Rauenbusch (1987) zjistil, že většinu druhů krytenek z lesní půdy a opadu se nevyskytuje v prostředích s pH lišícím se o více jak 1 stupeň. Ovšem ani další studie nezjistily průkazný vliv pH na druhové složení společenstva krytenek (Lousier 1975, Schröter 2001), ani na jejich biomasu (Bamforth 1971). Wanner (1991) sledoval vliv vápnění, hnojení, zavlažování, znečištění půdy kyselinou sírovou a chloridem sodným a aplikace insekticidů na společenstvo krytenek ve smrkových lesích. Všechny proměnné měly jen malý vliv na druhovou strukturu společenstva, avšak vápnění mělo pozitivní vliv na počet jedinců. Oproti tomu ošetření rašeliniště anorganickými formami dusíku, fosforu, draslíku a vápníku způsobilo změnu relativního druhového zastoupení krytenek ve prospěch menších druhů (což vedlo ke snížení biomasy krytenek) (Gilbert *et al.* 1998ab) a naopak obohacení tropické horské půdy anorganickým dusíkem biomasu krytenek zvýšilo (Krashevskaja 2008). Wanner *et al.* (2008) našli v půdě dubového lesa na stanovištích rekultivovaných po těžbě uhlí, chudých na dusík a fosfor, menší počet druhů a abundanci krytenek oproti kontrolním stanovištím.

Krytenky tvoří podstatnou část biomasy půdních organismů a významně se tak podílejí na koloběhu živin. Například v opadu čtyř evropských smrkových lesů byla biomasa krytenek srovnatelná s biomasou bakterií a vyšší nežli biomasa chvostoskoků, roztočů, hlístic a roupic dohromady (Schröter 2001). Kromě toho, že krytenky sloužily jako zdroj potravy výše uvedeným mnohobuněčným živočichům, podílely se také na přímé mineralizaci dusíku a uhlíku. Zatímco při mineralizaci dusíku byly krytenky nejvýznamnější skupinou půdních organismů (jejich příspěvek se na jednotlivých stanovištích pohyboval od 9 do 65 kg N/ha za rok a byl dvakrát vyšší, nežli příspěvek hub), k mineralizaci uhlíku přispívaly krytenky od 44 do 343 kg C/ha za rok (tedy asi desetkrát méně, nežli houby s bakteriemi, ale zato řádově více, nežli mnohobuněční živočichové) (Schröter 2001). Podobně Lousier *et* Parkinson (1984) v případě půdy topolového lesa spočítali, že množství uhlíku, které krytenky za rok prodýchají, činí 162 kg/ha, tedy asi 6% ročního přísunu uhlíku do půdy.

Krytenky s idiosomy absorbují křemík z prostředí a ukládají si ho do svých schránek. Tyto schránky se rychle rozkládají – v řádu dnů až týdnů (Lousier *et* Parkinson 1981, Meisterfeld *et* Heisterbaum 1986) – a jsou tak zdrojem křemíku pro další organismy. Aoki *et al.* (2007) při kultivaci půdy z dubo-borového lesa zjistili, že krytenky jsou hlavními konzumenty oxidu křemičitého rozpuštěného v půdním roztoku. Stanovili, že ačkoliv okamžitý obsah křemíku v krytenkách v různých lesních ekosystémech je zanedbatelný v porovnání s rostlinným opadem, díky krátkému životnímu cyklu je množství křemíku absorbované krytenkami za rok (10–227 kg SiO₂/ha) srovnatelné s množstvím uvolněným z rostlinného opadu ve stejných biotopech.

3.2.2. Krytenky a houby

Je dobře známou skutečností, že houby mohou sloužit jako zdroj potravy krytenek. Kultivační pokusy i pozorování obsahu potravních vakuol dokládají konzumaci spor hub např. u rodů *Euglypha*, *Nebela*, *Trinema*, *Phryganella* (Schönborn 1978, Coûteaux 1985, Ogden *et* Pitta 1990, Gilbert *et al.* 2000, 2003). Méně časté jsou záznamy o konzumaci úlomků mycelia, např. druhy *Arcella vulgaris*, *Euglypha strigosa*, *Heleopera rosea*, *Nebela tinctoria major-bohemica-collaris*, *Phryganella acropodia* (Laybourn *et* Whyman 1980, Ogden *et* Pitta 1990, Gilbert *et al.* 2000, Gilbert *et al.* 2003). Dle současných poznatků nelze s jistotou říci, zda krytenky napadají i živé mycelium. Kupříkladu Voník *et al.* (2011) nepozorovali žádné poškození mycelia houby *Anavirga laxa* obklopeného v kultivačním systému krytenkami *P. acropodia*. Kvasinky rovněž slouží jako zdroj potravy různým druhům krytenek, např. druhům *P. acropodia* a *Arcella gibbosa* (Meisterfeld *et al.* 1992, Torees *et* Jebram 1993, Meisterfeld *pers. com.*).

Na druhou stranu, krytenky mohou být napadány houbami, například anamorfami věckovýtrusých hub rodu *Orbilbia* nebo zástupci parazitického řádu Zoopagales či čeledi Olpidiaceae (Peach 1955, Bonnet 1964). Mrtvé schránky krytenek jsou rovněž rozkládány houbami (Meisterfeld *et* Heisterbaum 1986). Jednotlivé druhy hub využívají schránky odlišným způsobem – například zatímco *Rhizoscyphus ericae* porůstal v kultivačním experimentu hustě celý povrch schránky, *Phialocephala fortinii* schránky často vyplňovala a pravděpodobně více než schránky rozkládala jejich odumřelý obsah (Vohník *et al.* 2009). Někdy ani nelze s určitostí říci, zda jsou houbou rozkládány odumřelé schránky, nebo zda napadá živé jedince. Tak tomu bylo v případě obvykle na houbách a hmyzu parazitující anamorfní věckovýtrusé houby *Pochonia bulbillosa*, která při kultivaci borového opadu vytvářela konidiofory přednostně na schránkách krytenky *P. acropodia* (Vohník *et al.* 2011). Zdá se také, že houby ve své výživě preferují některé druhy krytenek nad jinými. Například v rhizosféře rododendronů se jednotlivé druhy krytenek lišily v podílu schránek porostlých myceliem; nejčastěji byly myceliem kolonizovány objemné schránky rodů *Trigonopyxis*, *Cyclopyxis* a *Centropyxis* (Vohník *et al.* 2009).

Mykorhizní houby patrně silně ovlivňují společenstva krytenek v rhizosféře. Například Ingham *et* Massicote (1994) při skleníkovém pokusu našli odlišná společenstva prvoků spjatá

s rozličnými druhy stopkovýtrusých ektomykorhizních hub. Krytenky se přitom vyskytovaly častěji v okolí kořenů kolonizovaných rozličnými zástupci rodu *Rhizopogon* nežli v okolí kořenů bez mykorhizy nebo kolonizovaných druhem *Thelephora terrestris* (skleníkový kontaminant), a nejméně se vyskytovaly v rhizosféře kořenů kolonizovaných další kontaminující houbou „*Mycelium radicis-atrovirens*“. V kontrastu s tím nebyl v podobném pokuse s ektomykorhizními houbami čechratkou podvinutou (*Paxillus involutus*) a klouzkem kravským (*Suillus bovinus*) nalezen jasný rozdíl v množství krytenek v rhizosféře obou druhů hub, a větší množství krytenek bylo na povrchu kořenů nemykorhizních nežli mykorhizních – pravděpodobně proto, že tyto kořeny hostí větší množství bakterií, a možná i kvůli většímu množství kořenových exsudátů (Timonen *et al.* 1998, 2004).

Rovněž saprotrofní houby ovlivňují půdní krytenky. Ve vzorcích půdy (včetně opadové vrstvy) z tropického horského lesa byl zjištěn průkazný vliv množství ergosterolu (a tedy hub) na druhové složení společenstva krytenek; koncentrace ergosterolu pozitivně korelovala s četnostmi pěti druhů krytenek: *Awerintzewia cyclostoma*, *Diffugiella oviformis*, *Euglypha compressa*, *P. acropodia* a *Sphenoderia lenta*, ostatní druhy byly spíše pozitivně ovlivněny množstvím gram-pozitivních bakterií nebo celkové mikrobiální biomasy. Koncentrace 16:1ω5c masté kyseliny (spjaté s přítomností arbuskulárně mykorhizních hub) neměla průkazný vliv (Krashevskaja *et al.* 2008). Zajímavé je, že když byla obohacením půdy glukózou zvýšena koncentrace hub v půdě, četnost většiny druhů krytenek poklesla. Je tedy možné, že detritovorní krytenky jsou v půdě antagonisty saprotrofních hub (Krashevskaja 2008). Rovněž Wanner *et al.* (2008) našli při pokusu s kolonizací celulózy v opadových sáčcích v humusovém horizontu německých dubových lesů průkazný vliv množství mycelia na substrátu na druhové složení společenstva krytenek. V tomto případě však efekt nebyl příliš konzistentní: zatímco po půl roce kultivace pozitivně korelovalo množství mycelia s četnostmi druhů *Euglypha rotunda*, *Tracheuglyphia dentata*, *Cyklopyxis kahli* a *Trinema* spp., po 8,5 a 13 měsících s nimi bylo spjato negativně. Vohník *et al.* (2011) sledovali při kultivaci borového opadu ve vlhkých komůrkách kolonizaci filtračního papíru krytenkami a myceliem anamorfní vřeckovýtrusé houby *Anavirga laxa*. Zjistili, že krytenky kolonizují ve vyšších četnostech filtrační papír porostlý myceliem nežli papír bez mycelia, a dále, že rozmístění nejčetnější krytenky *P. acropodia* na papíře porostlém houbou není náhodné – jedinci této krytenky byli průkazně blíže myceliu, nežli by odpovídalo náhodnému rozmístění. Protože však na myceliu nepozorovali žádné poškození, je pravděpodobné, že *P. acropodia* využívala ke své výživě myceliální exsudáty a bakterie spíše než mycelium (Vohník *et al.* 2011).

Je zřejmé, že o interakcích saprotrofních hub a krytenek máme zatím jen minimum informací, ačkoliv se jedná o staletí studované skupiny organismů, které jsou navíc významnými dekompozitory rostlinného opadu (Schröter 2001). Není například známo, zda saprotrofní houby v mírném pásu ovlivňují společenstvo krytenek i na přirozeném substrátu, zda celá tato ekologická skupina působí na krytenky podobným způsobem, nebo se konkrétní druhy hub ve svém efektu liší, nebo zda se jedná

o vliv přímý či zprostředkovaný jinými organismy. Smyslem předkládané práce je tuto mezeru v poznání vztahů organismů v opadu alespoň z části vyplnit.

3.3. Cíle a struktura práce

Ve své práci jsem se zaměřila na vztah krytenek a saprotrofních hub v opadu jehličnatých dřevin mírného pásu; obzvláštní pozornost jsem věnovala opadu smrku ztepilého (*Picea abies*). Snažila jsem se ověřit následující hypotézy:

- I. Houby z opadu jehličnanů ovlivňují prostorovou distribuci krytenek, a to jak v laboratorních podmínkách, tak na přirozeném substrátu.
- II. Krytenky v opadu konzumují spory a mycelia hub, myceliální exsudáty a bakterie asociované s myceliem.
- III. Krytenky mají odlišný vztah k různým druhům hub z opadu.

Abych mohla ověřit stanovené hypotézy, využila jsem čtyř různých metodických přístupů. V jejich rámci jsem hledala odpovědi na následující dílčí otázky:

1. Kultivace opadu tří druhů jehličnanů ve vlhkých komůrkách
 - Které druhy hub se vyskytují ve vlhkých komůrkách?
 - Které krytenky kolonizují filtrační papír vlhkých komůrek? Jsou jejich četnosti a distribuce ovlivněny druhem jehličnanu, přítomností mycelia a spor či konkrétními druhy hub?
2. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie
 - Jaké je druhové složení společenstva krytenek na jehlicích, mění se během kultivace a je ovlivněno množstvím mycelia na jehlicích?
 - Je některý druh krytenky na jehlicích asociován s myceliem?
3. Kultivační experiment s živým a usmrceným myceliem tří druhů hub
 - Jsou četnosti a rozmístění krytenek závislé na druhu houby a stavu mycelia?
4. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů
 - Jsou četnosti krytenek ovlivněny přítomností bakterií a autotrofních organismů?

Kromě těchto čtyř hlavních částí práce jsem ještě kultivovala krytenky v kulturách (pro experiment s živým a usmrceným myceliem) a testovala jejich odolnost vůči antibiotikům (za účelem experimentu s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů).

4. METODIKA

4.1. Lokality, odběr vzorků

Vzorky jehličí pocházely z Klánovického lesa (městská část Praha – Klánovice) a z národního parku České Švýcarsko (Krásná Lípa, městská část Vlčí Hora) (Tab. 1). Matečnou horninou byly na všech lokalitách pískovce, půda byla lehká, písčité až hlinito-písčité. Použila jsem jehlice z opadové vrstvy (L-horizont), sbírané vždy pod cílovou dřevinou: modřínem opadavým (*Larix decidua* Mill.), smrkem ztepilým (*Picea abies* (L.) Karsten) nebo borovicí lesní (*Pinus sylvestris* L.) (Tab. 2). Vzorky jsem ukládala do sterilních uzavíratelných polyethylenových sáčků a zpracovala pokud možno do 24 h; nebylo-li to možné, skladovala jsem je při 5 °C.

Tab. 1: Lokality odběru vzorků

Území	Kód lokality	Poloha	Souřadnice	Nadm. v. (m n. m.)	Orientace	Vegetace
Klánovický les	KL 1	120 m vých. od okraje obce (ul. Mechovka)	50°5'31"N 14°40'31"E	260	rovina	bezkolencová doubrava (<i>Molinio arundinaceae-Quercetum</i>), výsadba <i>P. sylvestris</i> , <i>P. abies</i> , roztroušeně <i>L. decidua</i> , E1: <i>Molinia arundinacea</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i>
	KL 2	250 m vých. od okraje obce (ul. Mechovka)	50°5'31"N 14°40'38"E	260	rovina	
	KL 3	280 m vých. od okraje obce (ul. Mechovka)	50°5'33"N 14°40'40"E	260	rovina	
České Švýcarsko	CS 1	Kamenný vrch (vrchol)	50°55'29"N 14°27'19"E	500	JV svah	modřínová monokultura (stáří 80 let), bez nižších vegetačních pater
	CS 2	Köglerova naučná stezka, mezi lokalitami Telenec a Pětidomí	50°55'53"N 14°27'17"E	460	J svah	
	CS 3	Křepelčí důl (v údolí Vlčího potoka)	50°55'59"N 14°26'22"E	350	dno ZSZ orient. rokle	podmáčená smrčina (<i>Bazzanio-piceetum</i>), E1: <i>Avenella flexuosa</i> , <i>Carex brizoides</i> , <i>Vaccinium myrtillus</i> , E0: <i>Sphagnum</i> spp., <i>Dicranum scoparium</i> , <i>Bazzania trilobata</i>
	CS 4	Křepelčí důl (v údolí Vlčího potoka)	50°56'0"N 14°26'23"E	380	skalní hřbet, JZ svah	acidofilní brusnicový bor (<i>Vaccinio myrtilli-Pinetum sylvestris</i>), E1: <i>Avenella flexuosa</i> , <i>Calluna vulgaris</i> E0: <i>Campylopus flexuosus</i> , <i>Cladonia</i> spp.

4.2. Kultivace ve vlhkých komůrkách

Pro současné studium hub a krytenek na jehlicích jsem použila metodu vlhkých komůrek. Do skleněné Petriho misky o průměru 14 cm jsem vložila polypropylenovou mřížku (velikost ok 2 mm, tloušťka mřížky 1,3 mm), na ni buničitou vatu a na ni filtrační papír (vše kruhy o průměru 13,5 cm). Misky jsem sterilizovala v autoklávu (125 kPa, 121 °C, 20 min). Do každé misky jsem poté doplnila 10 ml destilované vody sterilizované stejným způsobem. Na filtrační papír jsem přenesla jehlice z odběrových sáčků z opadu tří druhů jehličnanů (kap. 4.1) ze dvou oblastí (Tab. 1); v případě borového opadu jsem do komůrek vkládala celé svazky dvou jehlic. Založila jsem 18 vlhkých komůrek, vždy po třech opakováních od každé kombinace oblasti a druhu jehličnanu (Tab. 2). Vlhké komůrky jsem umístila na okenní parapet (mezi vnitřní a vnější díl dvoudílného okna) v budově Benátská 2 (Praha 2), kde byly vystaveny teplotnímu a světelnému režimu (střídání světla a tmy, denní a sezónní kolísání teploty), srovnatelnému s přirozenými podmínkami. Vlhké komůrky jsem pravidelně kontrolovala a v případě potřeby doplňovala sterilní vodu. Kultivace probíhala po 8 měsících.

Tab. 2: Vlhké komůrky – údaje o původu a počtu jehlic a datu založení

komůrka	zdroj opadu	lokality	počet jehlic*	celková délka jehlic (mm)	založeno			
B1	borovice lesní	KL 3	8	726	20. 3. 2009			
B2			8	822				
B3			8	676				
B5		modřín opadavý	CS 4	8	702	20. 4. 2009		
B6				8	658			
B7				8	617			
M1				32	598			
M2	smrk ztepilý	KL 2	32	509	20. 3. 2009			
M3			32	544				
M5			24	443				
M6		CS 1	CS 1	24	464	20. 4. 2009		
M7				24	633			
S1				KL 1	32		406	20. 3. 2009
S2					25		317	
S3	32	415						
S5	CS 3	CS 3	31	440	20. 4. 2009			
S6			32	475				
S7			32	507				

* U borovice se jedná o počet svazků dvou jehlic.

Vlhké komůrky jsem vyhodnocovala pod binokulární lupou (Leica EZ4, režim plného a průchozího světla, zvětšení 30×), zjišťovala jsem přítomnost a počet krytenek viditelných na filtračním papíře, každého jedince jsem přiřadila k té jehlici (resp. svazku dvou jehlic), jíž byl nejbližší. Dále jsem zaznamenávala přítomnost spor hub, přítomnost světlého mycelia a množství pigmentovaného mycelia na filtračním papíře na čtyřstupňové škále (0 – žádné viditelné mycelium na filtračním papíře; 1 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě menší než 1 hyfa na 1 mm jehlice, 2 – mycelium vyrůstá

z jehlice v hustotě 1–5 hyf na 1 mm jehlice, 3 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě větší než 5 hyf na 1 mm jehlice). Krytenky jsem určovala podle morfologických znaků schránek ve světelném mikroskopu (Olympus CX31, zvětšení 1000×), pracovala jsem s vodními preparáty. Krytenky jsem určovala podle těchto zdrojů: Clarke (2003), Ogden *et* Pitta (1989), Ogden (1984). Houby jsem určovala podle morfologických znaků za použití téhož mikroskopu, používala jsem preparáty v Meltzerově činidle a v kyselině mléčné. Houby jsem určovala zejména podle těchto publikací: Ellis 1971, 1976, Matsushima 1975, Crous *et al.* 2007.

4.3. Environmentální skenovací elektronová mikroskopie

Pro detailnější studium společenstva krytenek na smrkových jehlicích jsem použila environmentální režim (ESEM: -12 °C, 230 Pa, 20 kV, pracovní vzdálenost 8,6–11 mm) skenovacího elektronového mikroskopu FEI Quanta 200 (FEI, Brno), pozorování jsem realizovala v Optické laboratoři Botanického ústavu Akademie věd ČR. Protože při kultivaci opadového jehličí ve vlhkých komůrkách (kap. 4.2) se během prvního měsíce kultivace nejvíce krytenek objevilo v komůrkách s jehlicemi smrku ztepilého z lokality KL 1 (Tab. 1), vybrala jsem si pro další pozorování právě tento druh opadu a tuto lokalitu. Prohlédla jsem 12 opadových jehlic odebraných z lokality 20. 5. 2009 (tyto jehlice neprošly žádným druhem kultivace) a 12 jehlic kultivovaných po 8 měsících ve vlhkých komůrkách (kap. 4.2, vybrala jsem každou sedmou jehlici, tedy po 4 jehlicích z komůrek S1, S2 a S3). Protože se v režimu ESEM vzorky na stolek elektronového mikroskopu přilepují a při odlepování se jejich spodní strana poškozuje, a také se kvůli předešlému působení mrazu a vakua při odlepování často rozpadají, každou jehlici jsem studovala jen z jedné strany. Hodnotila jsem pokrytí jehlic myceliem na třístupňové škále (do 33%, 34–66%, nad 67%). Zaznamenala jsem všechny nalezené krytenky (za zvětšení 900×), u každého jedince jsem zaznamenala, zda byl či nebyl v kontaktu s myceliem. Krytenky jsem určovala (při zvětšení až 9000×) zejména podle publikací Ogden *et* Hedley (1980) a Clarke (2003), srovnávala jsem též s pracemi Leidy (1879), Deflandre (1936), Netzel (1977), Coûteaux *et al.* (1979), Ogden (1984), Ogden *et* Pitta (1989).

4.4. Kultivace krytenek

Pro získání dostatečného počtu jedinců pro další experimenty bylo nutné rozmnožovat krytenky v kulturách.

4.4.1. Kultivace druhu *Arcella discoidea* Ehrenberg, 1843

Krytenky druhu *A. discoidea* jsem kultivovala podle upravené metody Ogdena a Pitty (1989). Do sterilních skleněných Petriho misek (průměr 4 cm) jsem nanasla 2 ml obohaceného agarů (na 250 ml destilované vody 4 g agarů a 0,25 g drcených sušených mladých listů obilovin) a po ztuhnutí jej překryla 2 ml okyseleného Prescottova-Jamesova roztoku (Tab. 3). Misky i obě média jsem sterilizovala v autoklávu (125 kPa, 121 °C, 20 min) a příprava misek probíhala za sterilních podmínek. Do roztoku v miskách jsem sterilní jehlou přenesla 2–23 krytenek, odebraných z filtračního papíru

vlhkých komůrek (viz kap. 4.2). Ve shodě se vzorovou metodou (Ogden *et* Pitta 1989) jsem krytenky nesterilizovala, za potravu jim sloužily bakterie přenesené do kultury na jejich povrchu. Kultivace probíhala za teploty 21 °C. Kultury, v nichž došlo k rozmnožení krytenek, jsem přeočkovala obvykle po třech až čtyřech týdnech, krytenky jsem přenášela sterilní jehlou či pipetou. Krytenky jsem počítala pod binokulární lupou v režimu průchozího světla.

Tab. 3: Příprava okyseleného Prescottova-Jamesova roztoku

Postup při přípravě					
1. Připravit dílčí roztoky A, B, C a D.					
2. Po 0,1 ml roztoků A, B a C přidat k 999,7 ml destilované vody.					
3. Vzniklý roztok okyselit roztokem D v poměru 50 : 1 (obj.). Okyselený roztok má pH 6.					
Složení dílčích roztoků					
roztok A	roztok B	roztok C	roztok D		
CaCl ₂ 3,27 g	K ₂ HPO ₃ 5,12 g	MgSO ₄ 2,8 g	EDTA Ferric sodium	1 g	
KCl 1,62 g	H ₂ O 100 ml	H ₂ O 100 ml	H ₂ O	100 ml	
H ₂ O 100 ml					

4.4.2. Odolnost krytenky *A. discoides* vůči antibiotikům

Pro účely dalšího pokusu (kap. 4.6) jsem zkoušela odolnost krytenky *A. discoides* vůči antibiotikům. Namnožené krytenky jsem sterilní dutou jehlou přenesla do roztoku penicilinu G (Sigma-Aldrich; 300 U/ml) a streptomycin-sulfátu (Balkanpharma; 0,05 mg/ml) a do sterilní destilované vody (kontrola) ve sterilních skleněných Petriho miskách. Miskami jsem krátce zakroužila v ruce (přibližně 5 ot./3 s) a nechala je stát v klidu. Po pěti minutách jsem krytenky sterilní jehlou přenesla do sterilní destilované vody a takto omyté vložila do nových Petriho misek s obohaceným agarem a okyseleným Prescott-Jamesovým roztokem (kap. 4.4.1), do něž jsem přidala kapku roztoku z původní kultivační misky (jako inokulum bakterií – potravu krytenek). Pro každé antibiotikum a kontrolu jsem použila tři misky o 4–12 jedincích. Změny počtu krytenek v těchto kulturách jsem sledovala po 18 dní. Účinnost antibiotik vůči bakteriím jsem kontrolovala roztěrem vody, v níž byly krytenky omyty, na masopeptonovém agaru (masová infuze s 1% peptonu, 0,5% NaCl a 2% agaru), který byl poté kultivován při 21 °C po dobu 18 dní.

4.4.3. Kultivace druhu *Phryganella acropodia* (Hertwig et Lesser, 1874) Hopkinson, 1909

Pro kultivaci krytenky druhu *P. acropodia* jsem použila jednak stejnou metodu, jako pro druh *A. discoides*, jednak upravenou metodu Ralfa Meisterfelda (*pers. com.*): Do skleněných Petriho misek (průměr 4 cm) jsem nanasla 2 ml 1% agaru a po ztuhnutí jej překryla 2 ml upraveného Erdschreiberova média (Tab. 4). Do každé misky jsem přidala 1 kapku suspenze bentonitu ENOBENT MICRO v destilované vodě (1 g bentonitu na 15 ml vody) jako zdroj xenosomů. Do každé misky jsem sterilním párátkem přenesla malé množství kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen sloužících jako potrava. Petriho misky, agar, Erdschreiberovo médium a suspenzi bentonitu jsem předem vysterilizovala v autoklávu (125 kPa, 121 °C, 20 min). Z filtračního papíru vlhkých komůrek (viz kap. 4.2) jsem sterilní jehlou přenesla vždy několik krytenek do Petriho misky se

sterilním Erdschreiberovým médiem, misku jsem mírně protřepala v ruce a krytenky přenesla jehlou do roztoku v připravených kultivačních Petriho miskách (7–12 krytenek na misku). Kultivace probíhala za teploty 21 °C. Kultury, v nichž došlo k rozmnožení krytenek, jsem přeočkovala po čtyřech týdnech; krytenky jsem počítala pod binokulární lupou v režimu průchozího světla.

Tab. 4: Příprava upraveného Erdschreiberova média

Složení upraveného Erdschreiberova media	
KNO ₃	20 mg
KH ₂ PO ₄	10 mg
EDTA Ferric sodium	8 mg
voda z lokality původu krytenek (přefiltrovaná přes filtrační papír)	992,5 ml
extrakt z opadu	7,5 ml
Příprava extraktu z opadu	
1. 50 g smrkového opadu rozmíchat ve 120 ml destilované vody.	
2. Zahřát k varu a udržovat ve varu po dobu 30 min.	
3. Přefiltrovat přes filtrační papír.	
4. Filtrát doplnit destilovanou vodou do objemu 100 ml.	

4.5. Kultivace krytenky *A. discoides* s živým a mrtvým myceliem

Pro zodpovězení otázky, zda je výskyt krytenek ovlivněn druhem a fyziologickým stavem mycelia, jsem provedla následující experiment. Z komůrek S2 a S3 (Tab. 2) jsem po 19 dnech kultivace izolovala 6 morfotypů hub, jejichž mycelium bylo na filtračním papíře obklopeno krytenkami. Z těchto morfotypů jsem pro následující pokus vybrala tři nejrychleji rostoucí (H1 a H2 z komůrky S2, jehlice 22 a H3 z komůrky S3, jehlice 15). Na základě sekvenace ITS1-5,8S-ITS2 oblasti rDNA byla H2 identifikována jako *Herpotrichia juniperi* (Duby) Petr; pro H3 byl nejbližším izolátem stejné oblasti DNA v databázi GeneBank izolát Access. No. AY969660 (nekultivovaná vřeckovýtrusá houba, z půdy listnatého lesa; O'Brien *et al.* 2005); sekvenace H3 se nezdařila.

Na kolonie hub rostoucí v Petriho miskách na 2° sladivém agaru z pivovarnické sladiny (2% hm. sacharózy na 1000 ml destilované vody + 20 g agaru) jsem položila 10 kusů sterilních jehlic smrku ztepilého (z lokality KL 1). Po čtrnácti dnech inokulace jsem tyto jehlice přenesla do vlhkých komůrek (vždy jednu jehlici na Petriho misku), připravených stejně, jako v kap. 4.2, s těmito výjimkami: průměr misek byl 9 cm (čemuž odpovídal i průměr vkládaných částí) a komůrky byly zvlhčeny 2 ml sterilní destilované vody. Zároveň jsem připravila kontrolní komůrky, do nichž jsem vložila sterilní smrkové jehlice. Kultivace probíhala při teplotě 21 °C po dobu 35 dní, během níž mycelium porostlo filtrační papír v okolí jehlice. Poté jsem v polovině misek s inokulovanými jehlicemi mycelium usmrtila klávováním (125 kPa, 121 °C, 20 min). Vzniklo tak 6 variant pokusu (H1, H2 nebo H3, od každé houby mycelium živé nebo usmrcené) a kontrola, vždy po 5 opakováních (miskách). Do každé misky jsem poté vložila sterilní jehlou 8 jedinců krytenky druhu *A. discoides* z aktivních kultivačních Petriho misek (kap. 4.4.1), omytých ve sterilní filtrované vodě. Krytenky jsem umisťovala na jednu stranu od jehlice do vzdálenosti přibližně 2 cm od ní tak, aby nebyly v kontaktu

s myceliem. Zároveň jsem doplnila sterilní vodu, bylo-li potřeba, tak, aby byl filtrační papír vlhký. Výsledky pokus jsem zjišťovala po 10, 24 a 38 dnech pozorováním pod binokulární lupou v režimu průchozího a dopadajícího světla; zaznamenávala jsem počty krytenek, které byly v kontaktu s myceliem a mimo mycelium.

Pokus jsem zopakovala ještě jednou pouze s H2 (*H. juniperi*) a sterilními jehlicemi jako kontrolou, s několika změnami: Mycelium jsem po 13 dnech usmrtila lázní v 30% H₂O₂ po dobu 30 s, následně jsem komůrku promyla sterilní vodou a nechala 4 dny probíhat samovolnou redukci peroxidu. Poté jsem do každé komůrky pomocí pipety vložila 20 krytenek (a doplnila vodu, bylo-li třeba). Počty krytenek jsem zjišťovala po 22 dnech. Po dalších dvou dnech jsem tyto krytenky přenesla do nových Petriho misek připravených podle kap. 4.4.1, abych zjistila, zda jsou dosud schopné se rozmnožovat. Zároveň jsem do komůrek s živým myceliem a se sterilními jehlicemi přidala 10 nových krytenek *A. discoides* (na druhou stranu jehlice, nežli předešlé), jejichž počet jsem zjišťovala po 34 dnech.

4.6. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů

Pro zjištění, zda jsou krytenky ve vlhkých komůrkách svou výživou závislé na bakteriích, případně zelených řasách a sinicích, jsem založila následující pokus. Vlhké komůrky jsem připravila stejným způsobem, jako v kap. 4.5, s touto výjimkou: komůrky byly zvlhčeny 5 ml vody. Připravila jsem 40 komůrek, do každé jsem vložila pět jehlic z opadu smrku ztepilého, odebraných v říjnu z lokality KL 1 (Tab. 1). Kultivace probíhala za stejných podmínek, jako v kap. 4.2, avšak komůrky jsem navíc vložila po pěti do igelitových sáčků, abych zabránila jejich vysychání. Polovinu komůrek jsem zatemnila alobalem za účelem omezení růstu autotrofních organismů. Po 107 dnech kultivace jsem spočítala krytenky u jednotlivých jehlic (viz kap. 4.2) a jak zatemněné komůrky, tak nezatemněné komůrky jsem rozdělila na dvě poloviny vyvážené podle počtu nejčtenější krytenky (*P. acropodia*) a dále podle počtu ostatních krytenek. K polovině zatemněných a k polovině nezatemněných komůrek jsem po stěně připipetovala po 6 ml sterilního roztoku penicilinu G (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,31 mg/ml (v komůrkách byly tou dobou přibližně 4 ml vody, výsledná koncentrace penicilinu tedy odpovídala přibližně 300 U/ml). Po třech hodinách jsem z misek opatrně slila přebytečnou kapalinu, přidala po 10 ml sterilní destilované vody a vodu opět slila. Druhou polovinu misek jsem ošetřila stejným způsobem, ale místo roztoku penicilinu jsem použila destilovanou vodu. Celý proces jsem opakovala po 68 a 122 dnech. Vznikly tak čtyři pokusné varianty (zatemněné nebo nezatemněné, buď s antibiotiky, nebo bez nich), každá po 10 opakováních (miskách s pěti jehlicemi). Krytenky u jednotlivých jehlic jsem sečetla po 244 dnech kultivace (viz kap. 4.2), dále jsem u každé jehlice zaznamenala přítomnost spor hub a množství pigmentovaného mycelia na čtyřstupňové škále (viz kap. 4.2).

4.7. Statistické vyhodnocení

4.7.1. Analýza dat o druzích hub z jehlic kultivovaných ve vlhkých komůrkách

Druhové složení hub na jehlicích (kap. 4.2) jsem zkoumala technikami mnohorozměrné analýzy dat. Z analýzy jsem vyloučila taxony hub s frekvencí výskytu menší než 5 % (tedy takové, které se vyskytly na méně než 20 jehlicích). Identifikované i neidentifikované druhy rodu *Cladosporium* jsem zařadila do jednoho taxonu *Cladosporium* spp. Neidentifikované zástupce řádu Mucorales jsem zahrнула do jednoho taxonu. Následně jsem vyloučila snímky, na nichž se nevyskytoval žádný z hodnocených taxonů hub. Zbylo 252 jehlic („snímků“) a 7 taxonů hub („druhů“), z nichž nejvzácnější se vyskytoval na 9,9 % snímků. Data představují údaj o výskytu/absenci houby na jehlici.

Z důvodu presenčně-absenčního charakteru dat jsem používala unimodální techniky. Data jsem rozdělila technikou DCA (*detrended correspondence analysis*). Dále jsem testovala vliv druhu jehličnanu a lokality na druhové složení hub technikou CCA (*canonical correspondence analysis*), v prvním případě s lokalitou a v druhém s druhy jehličnanů jako kovariátami; permutační testy sestávaly ze 499 permutací prováděných v blocích definovaných kovariátami. Mnohorozměrné analýzy jsem provedla v programu Canoco for Windows 4.5 (Centre for Biometry Wageningen, CPRO-DLO, Nizozemsko), grafy jsem vyhotovila v programu CanoDraw 4.0 (ter Braak *et* Šmilauer 2002).

4.7.2. Analýza dat o krytenkách z jehlic kultivovaných ve vlhkých komůrkách

K analýze dat o četnostech krytenek ve vlhkých komůrkách (kap. 4.2) jsem použila zobecněné lineární modely (GLIM) s kvasi-poissonovským rozdělením závislé proměnné (toto rozdělení jsem upřednostnila před poissonovským, neboť reziduální deviance v modelech převyšovala příslušný počet stupňů volnosti) a logaritmickou transformační funkcí. Nejvhodnější model jsem hledala sestupným výběrem nezávisle proměnných (připouštěla jsem i interakce mezi nezávisle proměnnými), modely jsem srovnávala a jejich jednotlivé členy testovala F-statistikou (při hladině testu 0,05). Zabývala jsem se jen třemi dominantními druhy krytenek (*Arcella discoides*, *Phryganella acropodia* a *Assulina muscorum*), neboť další druhy jsem našla pouze v počtu několika jedinců; analyzovala jsem každý druh zvlášť.

Nejprve jsem testovala vliv území a druhu jehličnanu na četnost krytenky; data představovaly četnosti krytenek v jednotlivých komůrkách, vážené celkovou délkou jehlic v komůrce.

Dále jsem zjišťovala, zda je rozmístění krytenek v komůrkách ovlivněno množstvím pigmentovaného mycelia, přítomností světlého mycelia a přítomností spor. V tomto případě jsem z analýzy vyloučila komůrky, v nichž se vyskytovalo méně jak 1 % nalezených jedinců daného druhu krytenky. Takto zbylo k analýze 201 jehlic s 870 jedinci *A. discoides*, 241 jehlic s 19 196 jedinci *P. acropodia* a 192 jehlic s 29 408 jedinci *A. muscorum*; data představovaly počty krytenek v okolí jednotlivých jehlic. Jelikož se jednotlivé komůrky lišily počtem krytenek, do těchto modelů jsem vždy

zařadila jako první člen (první závislou proměnnou) příslušnost jehlice ke komůrce (která zároveň postihuje i příslušnost k území a druhu jehličnanu).

Nakonec jsem přistoupila k analýze vztahu krytenek k jednotlivým taxonům hub. Určené i neurčené zástupce rodu *Cladosporium* jsem zařadila do jednoho taxonu *Cladosporium* spp. Vybrala jsem takové taxony hub, které se v některé z kombinací jehličnanu a území vyskytly na více jak 15 % jehlic (po vyloučení komůrek, v nichž se vyskytovalo méně jak 1 % nalezených jedinců daného druhu krytenky), a k analýze jsem použila pouze data z těchto komůrek. Pro každou krytenku tak vznikly dvě až tři sestavy dat: a) sestava s houbami *Cladosporium* spp. a *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. zahrnovala 96 jehlic (komůrky M1-M3) pro druhy *A. discoides* a *P. acropodia*, resp. 64 jehlic (M1, M3) pro *A. muscorum*; b) sestava s houbami *Desmazierella acicola* Lib. a *Symptodiella acicola* W.B. Kendr zahrnovala 32 jehlic (B1-3, B5) pro druhy *A. muscorum* a *P. acropodia* (pro *A. discoides* by přicházely v úvahu jen dvě z komůrek, tj. 16 jehlic, a to považuji za příliš malý počet pozorování); c) sestava s neidentifikovanou sporulující věckovýtrusou houbou (Pezizomycotina sp. 1) zahrnovala 209 jehlic (B1-B3, M1-M3, S1-S3) pro *P. acropodia*, 201 jehlic (B1, B3, M1-M3, S1-S3) pro *A. discoides*, resp. 152 jehlic (B1-B3, M1, M3, S1, S3) pro *A. muscorum*. (Zavrhl jsem možnost analyzovat vztah *A. muscorum* a rhizomorf *Marasmius androsaceus* (L.) Fr., neboť v příslušné sestavě dat by z 32 jehlic bylo jen pět bez rhizomorf). V sestavách jsem nejprve vyloučila ty nezávislé proměnné (komůrka, tmavé mycelium, světlé mycelium, spory), které v nich nevykazovaly žádnou, nebo velice nízkou variabilitu (lišila se jedna nebo dvě jehlice), a ty, které pro daný druh krytenky nevyšly v předchozí analýze významné. Poté jsem v každé sestavě hledala nejvhodnější model ze zbylých proměnných a ten jsem srovnávala s modelem obohaceným o informaci o přítomnosti příslušného druhu houby. Zobecněné lineární modely jsem sestavovala a testovala v programu R 2.11.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vídeň, Rakousko).

4.7.3. Analýza dat získaných pozorováním jehlic v elektronovém mikroskopu

Analýzovala jsem četnosti jednotlivých druhů krytenek na 12 kultivovaných a 12 nekultivovaných jehlicích (kap. 4.3). Nejprve jsem pro kultivované a nekultivované jehlice (pro celé výběry dohromady) spočítala Shannonovy indexy diverzity (Shannon H). Shodu Shannonových indexů jsem testovala permutačním testem. Jedince, které nebylo možno určit do druhu, jsem z výpočtu vyloučila, neboť je možné, že náleželi k některému ze zahrnutých (zjištěných) druhů. Výpočty jsem provedla v programu PAST 2.07 (Hammer *et al.* 2001).

Dále jsem nahlížela na strukturu společenstva krytenek prostřednictvím mnohorozměrných technik. Z těchto analýz jsem vyloučila druhy krytenek s frekvencí výskytu menší než 10 % (tedy takové, které se vyskytly na méně než třech jehlicích). Vzhledem k tomu, že pouhé dva jedince rodu *Nebela* se mi podařilo určit do druhů, zahrнула jsem tyto jedince spolu s neurčenými do jedné kategorie *Nebela* spp. Obdobně jsem postupovala v případě druhu *Arcella discoides*, který jsem zahrнула spolu s neurčenými jedinci rodu *Arcella* do kategorie *Arcella* spp. Naopak u rodů, kde počet

jedinců určených do druhů počet neurčených jedinců výrazně převyšoval (rody *Trinema*, *Euglypha* a *Centropyxis*), jsem zachovala rozdělení na jednotlivé druhy a neurčené jedince (kteří mohli patřit k určeným druhům i k jiným druhům) jsem z analýzy vyloučila. Do analýz nakonec vstoupilo 13 taxonů („druhů“) a 24 jehlic („snímků“), data představují údaje o počtu jedinců daného taxonu na konkrétní jehlici. Pro následující mnohorozměrné analýzy jsem data transformovala; použila jsem druhou odmocninu počtu jedinců na jehlici.

Nejprve jsem zjistila délku gradientu v datech pomocí nepřímé unimodální analýzy DCA, dále jsem používala jen lineární analýzy. Pro zjištění vlivu kultivace na absolutní četnosti krytenek na jehlicích jsem použila přímou ordinační techniku RDA (*redundancy analysis*), pro zjištění vlivu kultivace na poměrné druhové zastoupení krytenek pak RDA se standardizací dat přes snímky; permutační testy v obou případech sestávaly ze 499 volných permutací. Výsledky jsem srovnala s nepřímou analýzou PCA (*principal component analysis*). Pro zjištění vlivu porostlosti jehlice myceliem na absolutní četnosti a poměrné druhové zastoupení krytenek jsem použila techniku RDA (bez a se standardizací dat přes snímky), s kultivací jako kovariátou; permutační testy sestávaly ze 499 permutací omezených na bloky definované kovariátou. Kultivace byla binární proměnnou s hodnotou 0 pro nekultivované jehlice, 1 pro kultivované. Porostlost jehlice myceliem jsem vyjádřila jako kvantitativní proměnnou s hodnotou 1 pro pokryvnost mycelia do 33%, 2 pro pokryvnost 34–66%, 3 pro pokryvnost nad 67%. Mnohorozměrné analýzy jsem dělala v programu Canoco for Windows 4.5 (Centre for Biometry Wageningen, CPRO-DLO, Nizozemsko), grafy jsem vyhotovila v programu CanoDraw 4.0 (ter Braak *et al.* Šmilauer 2002).

Dále jsem pomocí χ^2 testu homogenity (při hladině testu 0,05) zjišťovala, zda se některý/é z druhů krytenek nalézal/i v kontaktu s myceliem častěji než ostatní druhy, tj. srovnávala jsem počty jedinců jednotlivých druhů, které byly a nebyly v kontaktu s myceliem. Hodnotila jsem osm nejčetnějších druhů, tedy takových, pro něž očekávané četnosti nebyly nižší pěti. Výpočet jsem provedla v programu PAST 2.07 (Hammer *et al.* 2001).

4.7.4. Analýza dat o krytence *A. discoides* kultivované s živým a mrtvým myceliem

Data o kontaktu krytenek s myceliem tří druhů hub ve vlhkých komůrkách (kap. 4.5) jsem analyzovala pomocí logistické regrese. Nezávislou proměnnou byl kontakt/absence kontaktu jedince s myceliem, závislými proměnnými pak druh houby a stav mycelia (živé/mrtvé). K testování jsem použila X^2 statistiku (při hladině testu 0,05). Analýzu jsem provedla v programu R 2.11.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vídeň, Rakousko).

4.7.5. Analýza dat získaných kultivací jehlic s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů

Data o četnostech krytenek ve vlhkých komůrkách ošetřených čtyřmi způsoby (kap. 4.6) jsem analyzovala prostřednictvím zobecněných lineárních modelů (GLIM). Použila jsem modely s kvasi-poissonovským rozdělením závislé proměnné (neboť se jednalo o četnosti a reziduální deviance

v modelech převyšovala příslušný počet stupňů volnosti) a logaritmickou transformační funkcí. Nejvhodnější model jsem hledala sestupným výběrem nezávisle proměnných (včetně interakcí), k testování jsem použila F-statistikou (při hladině testu 0,05). Analyzovala jsem pouze četnosti druhu *P. acropodia*, neboť ostatní druhy krytenek se v jednotlivých variantách pokusu vyskytly pouze v jednom, nejvýše dvou opakováních. Z analýzy jsem vyloučila komůrky, v nichž se druh *P. acropodia* nevyskytoval.

Nejprve jsem zjišťovala vliv světelných podmínek a aplikace antibiotika; data představovaly četnosti krytenky v komůrkách po 244 dnech kultivace. Poté jsem testovala vliv množství mycelia a přítomnosti spor na distribuci jedinců; data představovaly počty krytenek v okolí jednotlivých jehlic po 244 dnech kultivace. Plný model v tomto případě zahrnoval také proměnnou příslušnost jehlice ke komůrce. Zobecněné lineární modely jsem sestavovala a testovala v programu R 2.11.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vídeň, Rakousko).

4.8. Seznam zkratk

Taxony hub a krytenek jsem pro potřeby analýz a grafů zkrátila níže uvedeným způsobem (Tab. 5, Tab. 6); ostatní zkratky jsou vysvětleny v textu.

Tab. 5: Taxony krytenek – zkratky použité v grafickém výstupu PCA

Zkratka	Taxon
ArcSpp	<i>Arcella</i> spp.
AssMus	<i>Assulina muscorum</i> Greef, 1889
CenAer	<i>Centropryxis aerophila</i> Deflandre, 1929
CorDub	<i>Corythion dubium</i> Taranek, 1882
EugCil	<i>Euglypha ciliata</i> (Ehrenberg, 1848) Leidy, 1878
EugCom	<i>Euglypha compressa</i> Carter, 1864
EugRot	<i>Euglypha rotunda</i> Weiles, 1911
EugStr	<i>Euglypha strigosa</i> (Ehrenberg, 1872) Wailes et Penard, 1911
NebSpp	<i>Nebela</i> spp.
PhrAcr	<i>Phryganella acropodia</i> (Hertwig et Lesser, 1874) Hopkinson, 1909
TriCom	<i>Trinema complanatum</i> Penard, 1890
TriEnc	<i>Trinema enchelys</i> (Ehrenberg, 1838) Leidy, 1878
TriLin	<i>Trinema lineare</i> Penard, 1890

Tab. 6: Taxony hub – zkratky použité v grafickém výstupu CCA

Zkratka	Taxon
Mar and	<i>Marasmius androsaceus</i> (L.) Fr.
Pez sp1	Pezizomycotina sp. 1
Sym aci	<i>Sympodiella acicola</i> W.B. Kendr.
Des aci	<i>Desmazierella acicola</i> Lib.
Cla spp	<i>Cladosporium</i> spp.
Muc spp	Mucorales Fr.
Alt alt	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.

5. VÝSLEDKY

5.1. Houby v opadu tří druhů jehličnanů

Na 400 jehlicích kultivovaných ve vlhkých komůrkách (kap 4.2) jsem našla 26 sporulujících druhů vřeckovýtusých hub, sporulující zástupce řádu Mucorales a rhizomorfy špičky žíněné (*Marasmius androsaceus*) (Tab. 7, primární data v příloze 9.1).

Tab. 7: Frekvence výskytu hub na jehlicích z opadu borovice lesní, modřínu opadavého a smrku ztepilého z Českého Švýcarska a z Klánovického lesa, po kultivaci ve vlhkých komůrkách

Taxon houby	Frekvence výskytu (%) ¹					
	České Švýcarsko			Klánovický les		
	borovice	modřín	smrk	borovice	modřín	smrk
Mucoromycota						
Mucorales			25,3			
Ascomycota (anamorfní)						
<i>Acrodontium crateriforme</i> (J. F. H. Beyma) de Hoog			1,1	8,3		
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	4,2	41,7	1,1		17,7	5,6
<i>Chaetosphaeria preussii</i> W. Gams & Hol.-Jech.			1,1			
<i>Chalara longipes</i> (Preuss) Cooke			2,1			
<i>Chalara</i> sp.						1,1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G. A. de Vries		2,8	1,1		9,4	
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	4,2				6,3	
<i>Cladosporium</i> spp.			1,1		9,4	
<i>Desmazierella acicola</i> Lib.	25	1,4		50		6,7
<i>Epicoccum nigrum</i> Link		5,6			2,1	
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (Penz.) Crous & Slippers		1,4				
<i>Oidiodendron</i> sp.	4,2					
<i>Penicillium</i> sp. (sekce <i>Biverticillium</i>)			1,1			
<i>Scolecobasidium</i> sp.						1,1
<i>Symptodiella acicola</i> W. B. Kendr.	54,2	2,8		79,2	2,1	
<i>Torula herbarum</i> (Pers.) Link		2,8				
<i>Trichoderma</i> spp.			17,9			
<i>Zalerion arboricola</i> Buczacki			2,1			
Pezizomycotina cf. <i>Taenionella</i> Nitschke ex F. Lehm.	4,2					
Pezizomycotina sp. 1	16,7	2,8	1,1	58,3	55,2	18
Pezizomycotina sp. 2			5,3			1,1
Pezizomycotina sp. 3			2,1			
Pezizomycotina sp. 4	4,2					
Pezizomycotina sp. 5	4,2	1,4			1,0	
Ascomycota (teleomorfní)						
<i>Coniochaeta</i> sp.	4,2					
<i>Sordaria</i> spp.	12,5	9,7	1,1			
Pezizomycotina sp. 6						1,1
Basidiomycota						
<i>Marasmius androsaceus</i> (L.) Fr.		2,8	70,5			
Podíl jehlic, z nichž vyrostlo mycelium (%)	91,7	41,7	24,2	100	35,4	62,9
Podíl jehlic se sporulujícími houbami (%)	83,3	52,8	37,9	100	78,1	27,0
Počet nalezených taxonů	10	9	15	4	8	7
Shannonův index diverzity (H)	1,811	1,487	1,55	1,21	1,447	1,402

¹ Podíl jehlic (v %) v dané kombinaci území a jehličnanu, na nichž se taxon hub vyskytoval.

Zkoumané dřeviny i lokality se lišily frekvencí výskytu mycelia na filtračním papíře vlhkých komůrek, frekvencí sporulace i diverzitou společenstva hub (Tab. 7). Mycelium vyrůstalo nejčastěji z borových jehlic, nejmenší podíl jehlic s myceliem byl u smrkových jehlic z Českého Švýcarska. Ke sporulaci docházelo rovněž nejčastěji na borových jehlicích, nejméně často pak na jehlicích smrkových. Diverzita (druhové bohatství i Shannonův index) byla vyšší u jehlic z Českého Švýcarska nežli z Klánovického lesa, ačkoliv v případě modřínových jehlic jsou rozdíly minimální.

Analýzy CCA potvrdily vliv území (Tab. 8) a druhu jehličnanu (Tab. 9, Obr. 5) na druhové složení společenstva hub (permutační test, $p \ll 0,05$), přičemž druh jehličnanu se jeví jako významnější faktor; ostatně obě na druhu jehličnanu závislé kanonické osy dohromady vysvětlily 21,3 % variability v datech ($0,898/4,222 \times 100$), což jsou dvě třetiny variability, kterou vůbec bylo možné zachytit dvěma osami (první 2 osy v analýze DCA totiž vysvětlily celkem 31,3 % variability).

Na borových jehlicích výrazně převládaly druhy *S. acicola* a *D. acicola*, doplněné ještě neidentifikovanou hyalinní anamorfoou vřeckovýtrusé houby *Pezizomycotina* sp. 1 (Tab. 7, Obr. 5). Zatímco na jehlicích z Českého Švýcarska se vyskytlo ještě sedm dalších druhů hub, na jehlicích z Klánovického lesa byl pouze jeden další druh (*A. crateriforme*) (Tab. 7).

V modřínovém opadu z Českého Švýcarska dominoval druh *A. alternata*, v Klánovickém lese u téhož jehličnu převládal druh *Pezizomycotina* sp. 1, ačkoliv *A. alternata* se tu vyskytovala rovněž s nezanedbatelnou četností. Preferenci modřínového opadu u tohoto ubikvitního, avšak spíše herbikolního druhu by bylo možné vysvětlit tenčí kutikulou a vůbec jemnější stavbou opadavých modřínových jehlic; podobná situace je i u druhu *E. nigrum* a u rodu *Cladosporium* (Tab. 7, Obr. 5). Ne zcela obvyklý je občasný výskyt typicky borových druhů *D. acicola* a *S. acicola* na modřínových (a v prvním případě i smrkových) jehlicích (Tab. 7).

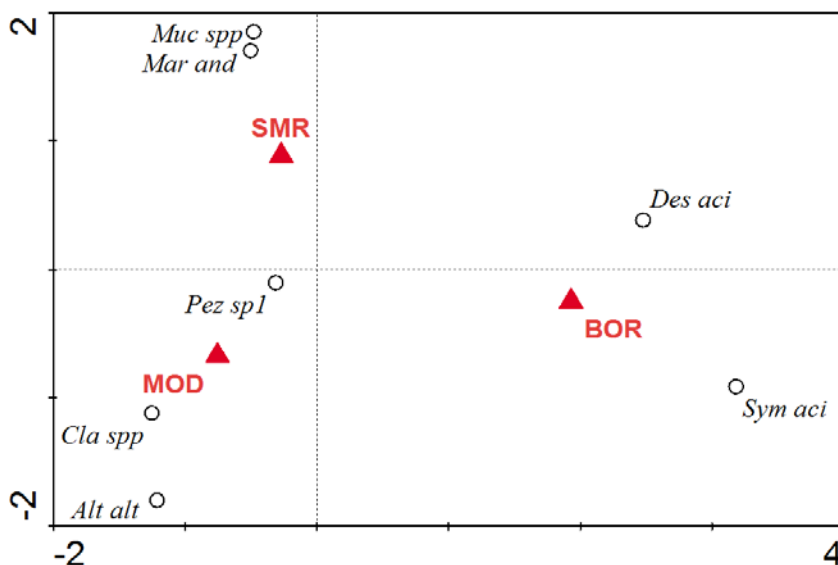
Ve smrkovém opadu z Českého Švýcarska se z vřeckovýtrusých hub vyskytoval s větší četností pouze rod *Trichoderma*. Na čtvrtině jehlic však sporulovali zástupci řádu Mucorales a přes 70 % jehlic porůstaly rhizomorfy špičky žiněné (*M. androsaceus*). Všechny tři druhy však zcela chyběly na smrkových jehlicích z Klánovického lesa, které se ostatně ukázaly nejchudší co do počtu sporulujících jedinců hub. Více jak jednou se zde vyskytly pouze druhy *Pezizomycotina* sp. 1, *D. acicola* a *A. alternata* (Tab. 7).

Tab. 8: Analýza CCA vlivu lokality na druhové složení hub na jehlicích

Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues	0.293	0.686	0.652	0.575	4.222
Species-environment correlations	0.685	0.000	0.000	0.000	
Cumulative % variance of species data	9.5	31.8	53.0	71.7	
Sum of all canonical eigenvalues (Trace) = 0.293, F = 26.120, p = 0.002					

Tab. 9: Analýza CCA vlivu druhu jehličnanu na druhové složení hub na jehlicích

Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues	0.515	0.383	0.686	0.652	4.222
Species-environment correlations	0.830	0.736	0.000	0.000	
Cumulative % variance of species data	14.0	24.4	43.0	60.8	
Sum of all canonical eigenvalues (Trace) = 0.898, F = 40.037, p = 0.002					



Obr. 5: Ordinační diagram CCA vlivu druhu jehličnanu na druhové složení hub na jehlicích

1. osa vysvětluje 12,2 % variability v datech, 2. osa 9,1 %.

5.2. Krytenky v opadu tří druhů jehličnanů

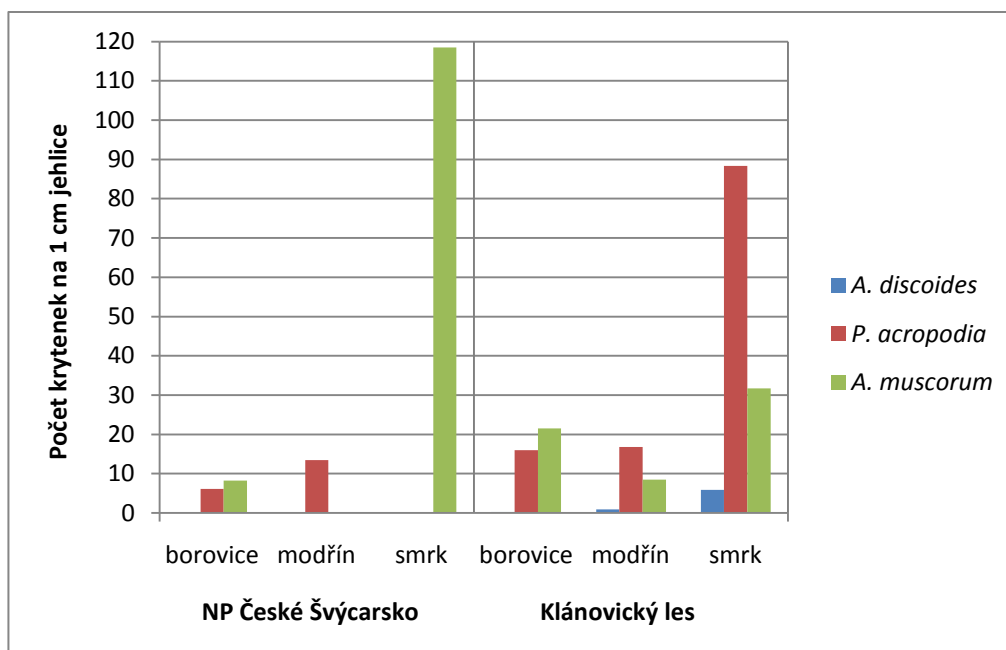
Ve vlhkých komůrkách (kap. 4.2), jejichž mykobiotu jsem rozebrala v předchozí kapitole (kap. 5.1), jsem našla celkem 5 druhů krytenek. Mezi nimi výrazně převládaly druhy *Assulina muscorum* a *Phryganella acropodia*, následované druhem *Arcella discoidea* (Tab. 10, primární data v příloze 9.1).

Tab. 10: Krytenky nalezené na filtračním papíře vlhkých komůrek

Druh hrytenky	Počet jedinců						Celkem jedinců
	České Švýcarsko			Klánovický les			
	borovice	modřín	smrk	borovice	modřín	smrk	
<i>Assulina muscorum</i> Greef, 1889	1728	18028		4863	1434	3835	29 888
<i>Phryganella acropodia</i> (Hertwig et Lesser, 1874) Hopkinson, 1909	1293	1786	11	3540	2794	9813	19 237
<i>Arcella discoidea</i> Ehrenberg, 1843			2	52	151	667	872
<i>Corythion dubium</i> Taranek, 1882			8				8
<i>Cyclopyxis kahli</i> Deflandre, 1929					5		5

Zobecněné lineární modely potvrdily odlišný výskyt druhů *A. discoidea* a *P. acropodia* ve studovaných územích a na opadu studovaných druhů jehličnanů (F-test, $p \ll 0,05$). Tyto druhy se vyskytovaly výrazně více v komůrkách z Klánovického lesa, přičemž nejvyšších četností zde dosahovaly ve smrkovém opadu (Tab. 10, Obr. 6). Právě na tento druh opadu jsem se zaměřila

v dalších částech své práce. *A. muscorum* se ve vlhkých komůrkách vyskytovala značně nepravidelně (v jedné z komůrek ze smrkového opadu z Českého Švýcarska se vyskytla v extrémním počtu 18 026 jedinců).



Obr. 6: Průměrný počet krytenek na filtračním papíře vlhkých komůrek (na centimetr jehlice vložené do komůrky)

Dále jsem zjišťovala, zda je rozmístění krytenek v komůrkách ovlivněno množstvím pigmentovaného mycelia, přítomností hyalinního mycelia a přítomností spor; do modelů jsem rovněž zařadila příslušnost jehlice ke komůrce, jejíž vliv vyšel vždy statisticky průkazný (GLIM, F-test, $p \ll 0,05$). Na hladině testu 0,05 jsem nezjistila vliv žádné z dalších uvedených proměnných na druh *A. discoides*. U druhu *A. muscorum* jsem zjistila průkazný pozitivní aditivní vliv přítomnosti spor ($p = 0,015$) a hyalinního mycelia ($p = 4,7 \cdot 10^{-6}$). Pro *P. acropodia* vyšel průkazný pozitivní (ač malý) vliv množství tmavého mycelia ($p = 0,017$), a dále interakce světlého mycelia s příslušností ke komůrce ($p = 5,4 \cdot 10^{-5}$) a interakce spor s příslušností ke komůrce ($p = 0,018$); vždy se jednalo o komůrku B5 (jednu ze dvou komůrek z Českého Švýcarska ve zkoumané sestavě dat). Poté, co jsem tuto komůrku z analýzy vyloučila, byl průkazný pouze vliv tmavého mycelia ($p = 0,017$).

Nakonec jsem se snažila zodpovědět otázku, zda četnost některého ze tří převládajících druhů krytenek koreluje s výskytem některého z nalezených taxonů hub. Otestovat jsem mohla pouze vliv druhů *A. alternata*, *D. acicola*, *S. acicola* a Pezizomycotina sp. 1 a rodu *Cladosporium*. Jediným druhem krytenky, u níž přidání informace o přítomnosti taxonu houby průkazně snížilo devianci modelu, byla *A. discoides*, u níž jsem našla pozitivní asociaci s rodem *Cladosporium* (GLIM, F-test, $p = 0,009$).

5.3. Společenstvo krytenek na smrkových jehlicích

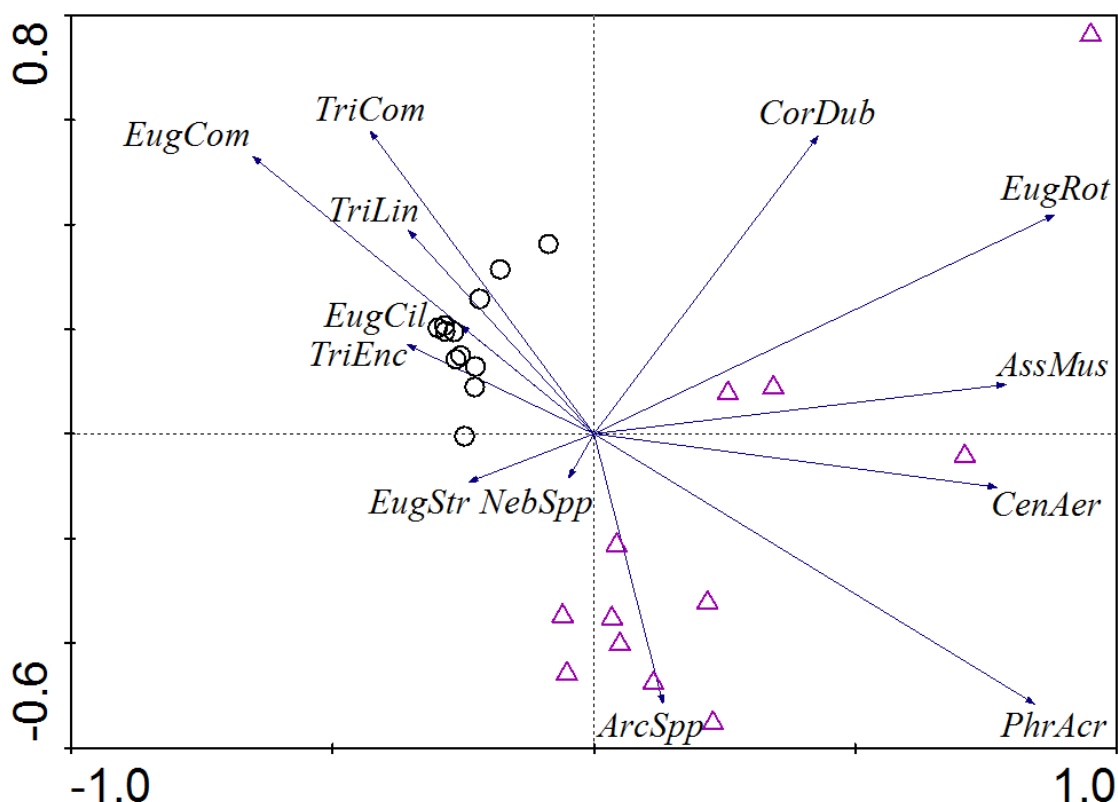
Na 12 jehlicích smrku ztepilého přímo z opadu a 12 kultivovaných jehlicích jsem ve skenovacím elektronovém mikroskopu (kap. 4.3) našla 21 druhů krytenek, patřících do 13 rodů (Tab. 11, primární data v příloze 9.2).

Tab. 11: Krytenky nalezené na kultivovaných a nekultivovaných smrkových jehlicích

Taxon krytenky	Počet jedinců	
	jehlice z opadu	jehlice po kultivaci
Arcellinida		
<i>Arcella discoides</i> Ehrenberg, 1843		8
<i>Arcella</i> spp.	1	9
<i>Bullinularia indica</i> (Penard, 1907) Deflandre, 1953		1
<i>Centropryxis aerophila</i> Deflandre, 1929		38
<i>Centropryxis</i> spp.		1
<i>Diffflugia minutissima</i> Penard, 1904	1	3
<i>Nebela collaris</i> (Ehrenberg, 1848) Leidy, 1879	1	
<i>Nebela tincta</i> (Leidy, 1879) Awerintzew, 1906	1	
<i>Nebela</i> spp.	1	3
<i>Phryganella acropodia</i> (Hertwig et Lesser, 1874) Hopkinson, 1909	5	429
Euglyphida		
<i>Assulina muscorum</i> Greef, 1889	12	258
<i>Corythion dubium</i> Taranek, 1882	24	29
<i>Euglypha acanthophora</i> Ehrenberg, 1841	1	
<i>Euglypha ciliata</i> (Ehrenberg, 1848) Leidy, 1878	6	
<i>Euglypha compressa</i> Carter, 1864	21	
<i>Euglypha rotunda</i> Weiles, 1911	9	288
<i>Euglypha strigosa</i> (Ehrenberg, 1872) Wailes et Penard, 1911	24	18
<i>Euglypha tuberculata</i> Dujardin, 1841	1	
<i>Euglypha</i> spp.	8	9
<i>Placocista spinosa</i> (Carter, 1865) Leidy, 1879	1	
<i>Tracheleuglypha dentata</i> (Penard, 1890) Deflandre, 1928	1	
<i>Trinema complanatum</i> Penard, 1890	29	1
<i>Trinema enchelys</i> (Ehrenberg, 1838) Leidy, 1878	5	
<i>Trinema lineare</i> Penard, 1890	9	
<i>Trinema</i> spp.	7	
Tectofilosida		
<i>Pseudodiffflugia gracialis</i> Schlumberger, 1845	1	
Celkem jedinců	169	1095
Shannonův index diverzity (H)	2,523	1,506

Na nekultivovaných jehlicích výrazně převládali zástupci řádu Euglyphida, a to jak menší (do 70 µm), převážně bakteriovorní druhy, jako *C. dubium* a *T. complanatum*, tak větší druhy plurivorní, např. *E. strigosa*. Do řádu Arcellinida patřilo jen 5,9 % jedinců. Poměrné zastoupení obou řádů se změnilo během kultivace, na kultivovaných jehlicích patřilo do řádu Arcellinida již 44,9 % jedinců, a to především kvůli výraznému nárůstu abundance mykofágního druhu *P. acropodia*, který se vyskytoval na všech kultivovaných jehlicích s dosti vyrovnanými četnostmi (v řádu desítek jedinců).

Oproti tomu *A. discoïdes*, kolonizující během kultivace filtrační papír vlhkých komůrek, se na jehlicích i po kultivaci vyskytovala nepravidelně a s řádově menší četností. V řádu Euglyphida během kultivace výrazně vzrostla četnost drobných druhů *A. muscorum* a *E. rotunda* (která se však vyskytla jen na polovině kultivovaných jehlic a navíc s řádově rozdílnými četnostmi) a naopak vymizela většina ostatních druhů. Na jehlicích s vysokou abundancí druhu *E. rotunda* chyběli zástupci rodu *Arcella* a druh *E. strigosa*. Výše uvedené skutečnosti se promítají také do grafického výstupu z analýzy PCA (Obr. 7).



Obr. 7: Ordinační diagram PCA druhového složení společenstev krytenek na jehlicích (bez standardizace dat)

1. osa vysvětluje 61,7 % variability v datech, 2. osa 16,4 %. Je dobře patrná změna druhového složení během kultivace (○ – jehlice nekultivované, △ – jehlice po kultivaci).

Pro mnohorozměrné analýzy společenstva krytenek na jehlicích je zásadní, že technika DCA ukázala délku gradientů v datech menší než 3 Gleasony, což značí oprávněnost použití lineárních technik (PCA a RDA).

Analýzy RDA s kanonickou proměnnou „kultivace“ prokázaly vliv kultivace na absolutní četnosti (Tab. 12) i poměrné druhové zastoupení (Tab. 13) krytenek na jehlicích (permutační test, $p \ll 0,05$).

Tab. 12: Analýza RDA vlivu kultivace na absolutní četnosti druhů krytenek na jehlicích

Axes	1	2	3	4
Eigenvalues	0.400	0.355	0.109	0.049
Species-environment correlations	0.853	0.000	0.000	0.000
Cumulative % variance of species data	40.0	75.5	86.4	91.3
Sum of all canonical eigenvalues (Trace) = 0.400, F = 14.687, p = 0.002				

Tab. 13: Analýza RDA vlivu kultivace na poměrné druhové zastoupení krytenek na jehlicích

Axes	1	2	3	4
Eigenvalues	0.393	0.161	0.132	0.093
Species-environment correlations	0.961	0.000	0.000	0.000
Cumulative % variance of species data	39.3	55.4	68.6	77.9
Sum of all canonical eigenvalues (Trace) = 0.393, F = 14.265, p = 0.002				

V této přímé ordinaci (RDA) vysvětlila kanonická osa 40 % variability v datech, při standardizaci přes snímky pak 39,3 %. V nepřímé ordinaci (PCA) vysvětlila první osa 61,7 %, při standardizaci přes snímky pak 42,9 % variability, což svědčí pro silný vliv kultivace na četnost a poměrné druhové zastoupení krytenek (kanonická osa závislá na kultivaci postihla 65 %, při standardizaci dokonce 90 % variability, kterou v datech vůbec bylo možné zachytit jednou osou). Vliv kultivace na druhové složení krytenek je ostatně možné sledovat i na grafickém výstupu z nepřímé techniky PCA (Obr. 7), kde jsou nekultivované a kultivované jehlice zřetelně prostorově rozděleny; na jehlicích přímo z opadu převládají druhy *E. compressa*, *E. ciliata* a *Trinema* spp., na kultivovaných jehlicích *P. acropodia* a *A. muscorum* (na polovině jehlic pak doplněné o druhy *E. rotunda* a *C. aerophila*, na druhé polovině o rod *Arcella* spp); zatímco druhy *C. dubium* a *E. strigosa* se vyskytovaly na kultivovaných i nekultivovaných jehlicích s podobnou četností. Kultivované a nekultivované jehlice se také signifikantně lišily diverzitou společenstva krytenek (permutační test pro Shannonův index, $p = 0,001$), přičemž na nekultivovaných jehlicích byla diverzita vyšší.

Analýzy RDA s kanonickou proměnnou „porostlost myceliem“ a kovariátou „kultivace“ neprokázaly vliv porostlosti jehlic myceliem na četnosti krytenek ($p = 0,406$) ani na jejich poměrné druhové zastoupení ($p = 0,438$).

Nakonec jsem zkoumala, zda se zástupci některého či některých z osmi nejčetnějších druhů krytenek nalézali v kontaktu s myceliem častěji než jiné druhy (Tab. 14). χ^2 test homogenity vztah druhu krytenky a afinity k myceliu neprokázal ($\chi^2 = 11,293$, $p = 0,12635$). Celkem jsem našla v kontaktu s myceliem 71 % jedinců krytenek.

Tab. 14: Frekvence kontaktu krytenek s myceliem

Druh krytenky	Frekvence kontaktu (% jedinců)
<i>Centropryxis aerophila</i>	81,6
<i>Euglypha strigosa</i>	73,8
<i>Euglypha rotunda</i>	72,1
<i>Phryganella acropodia</i>	71,9
<i>Assulina muscorum</i>	71,9
<i>Corythion dubium</i>	67,9
<i>Euglypha compressa</i>	57,1
<i>Trinema complanatum</i>	50,0

5.4. Kultivace krytenek

Při izolaci druhu *A. discoides* do kultury (kap. 4.4.1) došlo k rozmnožení krytenek ve třetině počátečních kultur (Petriho misek). V druhé generaci byl podíl misek, v nichž došlo k rozmnožování, vyšší, avšak s každým dalším přeočkováním klesala rozmnožovací schopnost krytenek; po čtvrtém přeočkování (tedy po více než třech měsících kultivace) se krytenky rozmnožovaly jen zřídka (Tab. 15). Při izolaci druhu *P. acropodia* do kultury, připravené stejnou metodou jako u *A. discoides*, byl podíl rozmnožujících se počátečních kultur vyšší, avšak po prvním přeočkování se rychlost rozmnožování zpomalila a po druhém přeočkování se rozmnožilo jen několik jedinců (Tab. 15). Při izolaci za použití upravené metody Ralfa Meisterfelda (kap. 4.4.3) došlo k rozmnožení krytenek ve všech počátečních miskách i v miskách po prvním přeočkování, avšak rychlost růstu byla výrazně nižší než u druhu *A. discoides* (Tab. 15). Pro další pokusy jsem tedy použila pouze druh *A. discoides*.

Tab. 15: Rozmnožování kultivovaných krytenek po jednotlivých přeočkováních

Počet přeočkování	Podíl misek, u nichž došlo k rozmnožování krytenek (%) ¹		
	<i>A. discoides</i> ²	<i>P. acropodia</i> ²	<i>P. acropodia</i> ³
počáteční kultury	35 (4,16)	43 (8,60)	100 (8,88)
po 1. přeočkování	77 (4,79)	66 (24,81)	100 (32,84)
po 2. přeočkování	69 (6,32)	10 (730,85)	
po 3. přeočkování	53 (8,65)		
po 4. přeočkování	24 (59,60)		

¹ V závorce je uvedena doba zdvojnásobení počtu jedinců (ve dnech) na misce s nejvyšším nárůstem počtu jedinců. Tato doba je vypočtená z počtu jedinců po třech týdnech kultivace; je-li tedy číslo vyšší než 21, znamená to, že k rozdělení došlo jen u části jedinců na misce.

² Upravená metoda Ogdena a Pitty

³ Upravená metoda Ralfa Meisterfelda

5.5. Odolnost krytenky *A. discoides* vůči antibiotikům

Zkouška odolnosti krytenky *A. discoides* vůči antibiotikům (kap. 4.4.2) ukázala, že ošetření penicilinem G nesnižuje schopnost rozmnožování tohoto druhu v kulturách, zatímco v případě streptomycin-sulfátu došlo (oproti kontrole) ke snížení nárůstu počtu jedinců (Tab. 16, primární data v příloze 9.3). Zatímco na misce s rozetřenou vodou, v níž byly omyty krytenky ošetřené penicilinem,

nebyly po 18 dnech viditelné kolonie bakterií, v případě streptomycinu se na misce objevilo 15 kolonií bakterií. V pokusu s omezením růstu bakterií (kap. 5.7) jsem použila ošetření penicilinem G.

Tab. 16: Rozmnožování krytenek po ošetření antibiotiky

Ošetření	Nárůst počtu jedinců po 18 dnech kultivace (%)	V kolika opakováních došlo k rozmnožení krytenek (max. 3)
penicilin G	94,4	3
streptomycin-sulfát	13,6	2
dest. voda (kontrola)	66,6	3

5.6. Kultivace krytenky *A. discoides* s živým a mrtvým myceliem

Ze 35 vlhkých komůrek se sterilními jehlicemi a jehlicemi s živým a usmrceným myceliem tří druhů hub (kap. 4.5) se krytenky rozmnožily jen ve čtyřech případech (se sterilní jehlicí, s H1 živou a dvakrát s H1 usmrcenou), vliv druhu a fyziologického stavu mycelia na četnosti krytenek tedy nebylo možné stanovit.

Protože se však jedinci v komůrkách pohybovali (původní umístění mimo mycelium se změnilo), bylo možné hodnotit frekvenci kontaktu s myceliem. Data sebraná v jednotlivých časových intervalech se však příliš nelišila (příloha 9.4), proto jsem k další analýze použila jen data získaná po 38 dnech kultivace (Tab. 17). Logistická regrese potvrdila závislost kontaktu krytenek s myceliem na druhu houby (X^2 -test, $p = 2,2 \cdot 10^{-16}$) a na stavu mycelia (X^2 -test, $p = 1,06 \cdot 10^{-9}$); krytenky byly častěji v kontaktu s živým nežli mrtvým myceliem a nejvyšší frekvence kontaktu s myceliem dosahovaly v komůrkách s druhem H3.

Tab. 17: Frekvence kontaktu krytenek s živým a usmrceným myceliem tří druhů hub

Druh houby	Frekvence kontaktu krytenek (% jedinců)	
	s živým myceliem	s mrtvým myceliem
H1	38,9	15,8
H2 (<i>Herpotrichia juniperi</i>)	71,9	12,5
H3	100	93,3

Při opakování pokusu pouze s *H. juniperi* se ukázalo, že usmrcení mycelia peroxidem vodíku silně poškozuje mycelium; krytenky přenesené do těchto systémů byly již při prvním sběru dat rovněž poškozeny a proto jsem tuto variantu dále nezahrnula. Po přidání prvních 20 jedinců *A. discoides* na každé opakování opět nedošlo k rozmnožení krytenek, ačkoliv po zpětném přenesení těchto krytenek do kultury (kap. 4.4.1) k rozmnožování došlo, z čehož lze vyvodit, že tyto krytenky ve vlhkých komůrkách neodumřely, avšak nebyly schopné se zde rozmnožovat. Při přidání jiných 10 jedinců do každého opakování pokusu došlo k rozmnožení krytenek v jednom opakování s živou *H. juniperi* a ve třech opakováních se sterilními jehlicemi, přičemž právě v těchto třech komůrkách se (na rozdíl od ostatních komůrek) objevil v okolí jehlice bakteriální sliz (příloha 9.4).

5.7. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů

Ve 40 vlhkých komůrkách s 200 jehlicemi smrku ztepilého kultivovaných při dvou světelných režimech a s nebo bez ošetření antibiotikem (kap. 4.6) jsem našla čtyři druhy krytenek (Tab. 18, primární data v příloze 9.5).

Tab. 18: Četnosti krytenek ve čtyřech variantách pokusu po 244 dnech kultivace

Druh krytenky	Počet jedinců v jednotlivých variantách pokusu ¹				Celkem jedinců
	střídavý světelný režim		temnotní světelný režim		
	bez antibiotika	s antibiotikem	bez antibiotika	s antibiotikem	
<i>Phryganella acropodia</i>	2830 (5)	3116 (6)	1177 (2)	1449 (3)	8572
<i>Arcella discoides</i>	792 (2)	36 (1)	39 (1)	15 (1)	882
<i>Assulina muscorum</i>				512 (2)	512
<i>Cyclopyxis kahli</i>	60 (1)				60

¹V závorce je u každé varianty uveden počet opakování (komůrek), v nichž se druh vyskytl (max. 10).

Krytenky *P. acropodia* a *A. discoides* dosáhly více jak dvojnásobné četnosti v komůrkách se střídavým světelným režimem nežli v zatemněných komůrkách, u prvního druhu je rovněž nápadný velký rozdíl v počtu obsazených komůrek u obou světelných režimů. Více jedinců tohoto druhu jsem našla v komůrkách s aplikací antibiotika, u druhu *A. discoides* je situace opačná. Druh *A. muscorum* se vyskytl ve vysokých četnostech pouze ve dvou zatemněných komůrkách s aplikací antibiotik, zatímco druh *C. kahli* se vyskytl pouze v jedné osvětlené komůrce bez antibiotik.

Závislost četnosti krytenek na světelném režimu a ošetření antibiotiky jsem mohla testovat pouze pro druh *P. acropodia*. Zobecněné lineární modely nepotvrdily (na hladině testu 0,05) význam žádného z faktorů. U téhož druhu jsem s využitím zobecněných lineárních modelů testovala vliv množství mycelia na filtračním papíře a přítomnosti spor hub na počty krytenky v okolí jednotlivých jehlic; ani v tomto případě nebyl vliv žádného z faktorů na hladině testu 0,05 průkazný.

6. DISKUSE

6.1. Použitá metodika

Pro současné studium krytenek a hub v opadu jehličnanů jsem použila metodu kultivace ve vlhkých komůrkách. Tato metoda byla již dříve použita při studiu saprotrofních hub na jehlicích (Kendrick *et* Burges 1962, van Maanen *et* Groubière 1997, Koukol 2007). Houby jsem určovala na základě morfologických znaků; hlavní nevýhodu tohoto postupu byla nemožnost identifikace sterilního mycelia přítomného na filtračním papíře. K jeho určení by bylo možné použít molekulárních metod, avšak v případě sterilního mycelia tří druhů hub, které jsem izolovala z vlhkých komůrek a použila v jednom z experimentů, nepřinesla ani sekvenace ITS oblasti rDNA potřebné výsledky (viz kap. 4.5).

Kultivační techniky, používané pro identifikaci a stanovení denzity většiny půdních prvoků, jako je například „most probable number“ (MPN), nejsou příliš vhodné pro studium krytenek, neboť jen málo druhů se za takových podmínek rozmnožuje (Ekelund *et* Rønn 1994, Schröter 2001, Timonen *et al.* 2004). Metoda kultivace ve vlhkých komůrkách byla dosud při studiu krytenek použita jen jednou. Publikované (Vohník *et al.* 2011) i zde prezentované (kap. 5.2, srov. kap. 5.3) výsledky ukazují, že jen některé druhy se v těchto kultivačních podmínkách rozmnožují a že jen část druhů přítomná na substrátu kolonizuje filtrační papír a je tak rozeznatelná a kvantifikovatelná při použití optických pomůcek. Toto omezení bylo částečně kompenzováno přímým pozorováním jehlic ve skenovacím mikroskopu. Nicméně, výhodou kultivace ve vlhkých komůrkách je možnost současné identifikace krytenek i hub (kap. 5.1 a 5.2), a také možnost pokusné manipulace (kap. 5.6 a 5.7).

Na rozdíl od většiny ostatních půdních prvoků je u krytenek díky přítomnosti schránky možná přímá identifikace a kvantifikace, bez předchozí kultivace vzorků. Při přímém pozorování ovšem dochází k přehlížení, podhodnocení nebo nepřesné identifikaci menších druhů (Schröter 2001, Aoki 2003), čemuž lze předejít použitím elektronové mikroskopie (Aoki 2003). Ta hraje nezastupitelnou úlohu, chceme-li pozorovat krytenky, aniž bychom je odlučovali od jejich substrátu. Ačkoliv Vohník *et al.* (2009) pozorovali v optickém mikroskopu krytenky spojené myceliem s jemnými kořeny rododendronů, Wanner *et al.* (2008) shledali obtížným rozeznat v optickém mikroskopu krytenky na celulósových membránách, které během kultivace v opadovém sáčku ztmavly a spojily se dohromady. Podobně ani částice opadu nejsou průsvitné; použití skenovací elektronové mikroskopie je v takovém případě smysluplnou volbou. Dosud je mi známa jen jedna studie, v níž autoři identifikovali a kvantifikovali krytenky v opadu na přirozeném substrátu (konkrétně borových jehlicích, Vohník *et al.* 2011), a žádná, kde by se tak dělo bez předchozí kultivace substrátu, jako je tomu u části dat prezentovaných v kap. 5.3.

Při kultivaci krytenek *Phryganella acropodia* a *Arcella discoides* v kulturách jsem užila metod, použitých pro tyto druhy dalšími badateli (Ogden *et* Pitta 1989, Ogden 1991, Meisterfeld *pers. com.*). V případě prvního druhu bylo už v počáteční kultuře rozmnožování o více než polovinu

pomalejší oproti údajům uvedeným v literatuře (Ogden *et* Pitta 1990) a po přeočkování již kultury neposkytovaly dostatek nových jedinců (kap. 5.4); příčinu tohoto stavu se mi zjistit nepodařilo. Pro *A. discoides* Ogden (1991) neuvádí údaje o reprodukci. Při kultivaci druhu *A. vulgaris* v odlišném médiu (Laybourn *et* Whymant 1980) bylo dosaženo rychlosti rozmnožování vyšší nežli v mé práci (Tab. 15), nicméně i mnou použitá metoda poskytla životaschopné krytenky, ačkoliv pouze do čtvrtého přeočkování. Jedinci pro pokusy byli odebráni z dobře se rozmnožujících kultur po prvním a druhém přeočkování, kdy ještě nedošlo k velkému poklesu rozmnožovací schopnosti (Tab. 15).

Přesto se tyto krytenky nerozmnožovaly ve vlhkých komůrkách osídlených pouze jedním druhem houby, inokulovaným na vysterilizovanou jehlici (kap. 5.6), ačkoliv při kultivaci nesterilních jehlic (kap. 5.2 a 5.7) anebo při viditelné kontaminaci komůrek bakteriemi (kap. 5.6, dodatečný pokus s houbou *Herpotrichia juniperi*) se rozmnožovaly. Naposledy zmíněný pokus ovšem také ukázal, že krytenky v komůrkách s jedním druhem houby (anebo sterilní jehlicí) ani nehynou (kap. 5.6). Uvedené skutečnosti je možné vysvětlit tak, že zatímco v komůrkách s nesterilními opadovými jehlicemi se mohou krytenky na filtračním papíře živit přítomnými bakteriemi a sporami hub, v pokusu s inokulovanými houbami si musely vystačit (kromě úlomků mycelia a myceliálních exsudátů) především s bakteriemi, jejichž inokulum přinesly do komůrek na svém povrchu. Rychlost růstu bakterií v komůrkách je patrně nižší, nežli v kulturách *A. discoides* s agarovými plotnami překrytými tekutým médiem (kap. 4.4.1), a bakterie jakožto zdroj potravy tak nedostačují k vytváření nových jedinců krytenek. Protože se však jedinci v komůrkách pohybovali (původní umístění mimo mycelium se změnilo, kap. 5.6), bylo možné pokus s živým a usmrceným myceliem vyhodnotit.

V experimentu s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů (kap. 5.7) bylo mým cílem zjistit, zda jsou krytenky ve vlhkých komůrkách svou výživou závislé na bakteriích nebo autotrofních organismech přítomných na filtračním papíře a jehlicích. Protože však u několika druhů krytenek rodu *Arcella* (včetně *A. discoides*) byly nalezeny endocytobiotické bakterie (rozmanitého fylogenetického zařazení), které nepoškozovaly hostitele a mohly by tedy být mutualistickými symbionty těchto krytenek (Török *et al.* 2008), považovala jsem za potřebné před svým experimentem otestovat odolnost *A. discoides* vůči antibiotikům – ukázalo se, že aplikace penicilinu G tuto krytenku nepoškozuje (Tab. 16). Oproti pokusu s kultivací jehlic tří druhů jehličnanů jsem v experimentu s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů použila vyšší počet opakování (komůrek), ovšem s menším počtem jehlic na misku. Toto uspořádání se však neukázalo vhodným, neboť krytenky se nyní vyskytovaly jen ve zlomku komůrek (Tab. 18), ačkoliv při kultivaci jehlic téhož jehličnanu z téže lokality s větším počtem jehlic na misku (kap. 5.2) se tři nejčtenější druhy krytenek vyskytly ve všech komůrkách. Domnívám se, že příčinou tohoto stavu byl nepravidelný výskyt studovaných druhů krytenek na jednotlivých jehlicích v opadu; tuto domněnku podporují i data z nekultivovaných jehlic prohlížených v elektronovém mikroskopu (příloha 9.2). Pouze jeden druh krytenky, *P. acropodia*, se vyskytl v takovém počtu komůrek, aby bylo možné jeho četnosti hodnotit. U tohoto druhu jsem sice odolnost vůči antibiotikům netestovala, nicméně jelikož v experimentu vykázal vyšší výskyt

v komůrkách ošetřených antibiotiky, je zřejmé, že ani jej vlastní ošetření penicilinem nepoškozuje. Bohužel však nebylo v mých možnostech kvantifikovat, nakolik ošetření penicilinem G zredukovalo populaci bakterií ve vlhkých komůrkách; výsledky pokusu je tedy třeba v tomto směru brát s rezervou.

6.2. Houby v opadu tří druhů jehličnanů

Abych mohla sledovat výskyt krytenek v souvislosti s konkrétními druhy hub, musela jsem nejprve zodpovědět otázku, jaké je druhové spektrum hub ve vlhkých komůrkách. Na jehlicích z opadu kultivovaných ve vlhkých komůrkách jsem našla 28 druhů hub (Tab. 7). Převážně se jednalo o anamorfní zástupce mikroskopických věckovýtrusých hub, v menší míře se však vyskytly i teleomorfní věckovýtrusé houby, zástupci řádu Mucorales a také jeden druh makroskopický – stopkovýtrusá houba špička žíněná (*Marasmius androsaceus*). Jehlice tří studovaných druhů jehličnanů přitom hostily odlišné druhové spektrum hub.

Na jehlicích borovice lesní (*Pinus sylvestris*) převládaly druhy *Desmazierella acicola* (respektive její anamorfa *Verticicladium trifidum*) a *Symptodiella acicola*. *D. acicola* je významným dekompozítorem borových jehlic (Kendrick *et* Burges 1962, Ponge 1991, Tokumasu *et al.* 1994, Koukol 2007), méně často se vyskytuje i na jiných rodech jehličnanů (van Maanan *et* Groubière 1997), *S. acicola* je známá výraznou afinitou k borovici lesní (Tokumasu *et al.* 1994, Koukol 2007); opakovaný výskyt těchto druhů na modřínových jehlicích tedy stojí za povšimnutí. Je zajímavé, že na jehlicích z obou studovaných lokalit se nevyskytovala sypavka borová (*Lophodermium pinastri*), jejíž stromata i mycelium jsou obvykle nalézána na borových jehlicích v počátečních stádiích dekompozice (Kendrick *et* Burges 1962, Hayes 1965, Ponge 1991, Groubière *et al.* 2001, Lindahl *et al.* 2007) a která se s vysokou frekvencí vyskytovala i na jiné lokalitě v národním parku České Švýcarsko (Koukol 2007). Je také známo, že výskyt druhu *L. pinastri* v opadových jehlicích omezuje jejich kolonizaci houbou *D. acicola* (Ponge 1991, Groubière *et al.* 2001), tedy druhem v mé práci značně frekventovaným.

Jehlice smrku ztepilého (*Picea abies*) byly v mé práci nejčastěji kolonizovány špičkou žíněnou (*M. androsaceus*), která je významným dekompozítorem borových jehlic (Ponge 1991, Lindahl *et al.* 2007, Boberg 2009), vyskytuje se však i v opadu smrku ztepilého (Korkama-Rajala *et al.* 2008) a dalších dřevin (Boberg 2009).

Jehlicím modřínu opadavého (*Larix decidua*) v mé práci dominovaly druh *Alternaria alternata* a rod *Cladosporium*; na dalších dvou studovaných jehličnanech se tyto ubikvitní houby vyskytovaly minimálně. To kontrastuje s dříve zjištěnou vysokou frekvencí výskytu těchto hub v opadu smrku ztepilého a různých druhů borovic (Widden *et* Parkinson 1973, Tokumasu *et* Aioki 2002, Przybył *et al.* 2008). V těchto pracích však byla k nalezení přítomných hub použita kultivace jehlic na agarových plotnách; oproti tomu v opadu borovice lesní a borovice vejmutovky (*Pinus strobus*), kultivovaném ve vlhkých komůrkách, byly oba taxony nalézány méně často (Koukol 2007) a při pozorování vzorků jehlic borovice lesní přímo z terénu nebyly nalezeny vůbec (Ponge 1991). Ani

analýzou DNA v opadu téhož jehličnanu nebyla zjištěna přítomnost *A. alternata*, rod *Cladosporium* se vyskytoval jen vzácně (Lindahl *et al.* 2007). V kontextu uvedených prací mé výsledky dokládají nejen význam zvolené metody pro studium hub v opadu, ale i skutečnost, že oba výše zmíněné taxony hub mají pravděpodobně jen malou úlohu při dekompozici smrkového a borového opadu. Jejich afinitu k opadu modřínu si vysvětlují větší atraktivitou jednoletých, málo trvanlivých modřínových jehlic pro nespecializované, rychle rostoucí druhy hub.

6.3. Společenstvo krytenek na smrkových jehlicích

Protože pozorování jehlic v elektronovém mikroskopu (kap. 4.3 a 5.3) metodicky navazovalo na kultivaci opadu ve vlhkých komůrkách (kap. 4.2 a 5.2), v metodické a výsledkové části své práce jsem jej uváděla až za těmito kapitolami. Výsledky tohoto pozorování však ovlivnily interpretaci dalších výsledků, a proto je zde diskutuji přednostně.

První otázkou této části práce bylo, jaké je druhové složení společenstva krytenek na jehlicích. Celkem jsem v opadu smrku ztepilého našla 21 druhů krytenek, přičemž na jehlicích jak na počet druhů, tak na počet jedinců převládal řád *Euglyphida* (Tab. 11). Druhové spektrum nalezené na smrkových jehlicích se příliš nelišilo od dalších záznamů z evropských či kanadských smrkových a borových lesů (ačkoliv někteří autoři zaznamenali větší či menší druhové bohatství), s jednou výjimkou: v žádné z těchto prací nefiguruje *A. discoides* (Lousier 1975, Schönborn 1975, Rauenbusch 1987, Wanner 1991, Schröter 2001, Vohník *et al.* 2011). Výskyt této krytenky na jehlicích a ve vlhkých komůrkách je diskutován níže (kap. 6.4).

V dosavadních studiích krytenek v opadu jehličnanů, listnatých dřevin i bylin (Schönborn 1975, 1978, Lousier 1975, 1982, Laminger 1978, Rauenbusch 1987, Wanner 1991, Schröter 2001, Todorov 2001, Krashevskaja 2008) byly vzorky různými způsoby homogenizovány, promývány, filtrovány apod. za účelem oddělení krytenek od částic opadu. Patrně z důvodu výše diskutovaných metodologických obtíží (kap. 6.1) postrádá literatura o krytenkách v opadu údaje o jedincích přímo na (neošetřovaném) substrátu. Prezentované výsledky (kap. 5.3, příloha 9.2) jsou dle mých vědomostí v tomto směru prvním příspěvkem. Krytenky se na nekultivovaných jehlicích vyskytovaly v počtu čtyř až 32, v průměru pak 14 jedinců na jednu (pozorovanou) stranu jehlice. Tato čísla umožňují představit si denzitu krytenek v opadu z poněkud jiné (více „krytenkocentrické“) perspektivy, nežli obvyklé vyjádření počtu jedinců na hektar. Má data také ukazují, že druhové zastoupení krytenek na jednotlivých jehlicích je relativně rovnoměrné (na prohlížených částech jehlic bylo od čtyř do devíti druhů, přičemž k nejčetnějšímu druhu patřila obvykle čtvrtina jedinců krytenek), tedy nikoliv takové, že by na jedné jehlici převládali jedinci jednoho druhu (například díky efektu prvního příchozího), jako se tomu stávalo v prvních měsících kolonizace celulózové membrány uložené v opadu (Wanner *et al.* 2008).

Porovnání jehlic odebraných přímo z terénu s jehlicemi kultivovanými ve vlhkých komůrkách přineslo jednoznačnou odpověď na otázku, zda se druhové složení společenstva krytenek během

kultivace mění. Analýza RDA prokázala vliv kultivace na druhové složení společenstva krytenek (Tab. 12, Tab. 13) a permutační test prokázal snížení diverzity krytenek během kultivace (kap. 5.3). Snížení druhového bohatství krytenek na jehlicích zdnalivě kontrastuje s opačným trendem v pokusech s opadovými sáčky (Lousier 1982, Wanner *et al.* 2008); tento rozdíl je způsoben tím, že zatímco v uvedených experimentech byl substrát kolonizován dalšími druhy z okolí, ve vlhkých komůrkách naopak mohlo druhů pouze ubývat. Zajímavější je ovšem výrazná změna struktury společenstva, v němž zcela převládly tři druhy krytenek (*P. acropodia*, *Euglypha rotunda* a *Assulina muscorum*); kromě nich vzrostl během kultivace i počet jedinců *Centropyxis aerophila* a *A. discoides* (Tab. 11, Obr. 7). S výjimkou posledně jmenované se jedná o druhy běžně nalézané v opadu (Clarke 2003), které však dosahují vyšších četností v nižších vrstvách půdního nadloží (Rauenbusch 1987) a také dominují na substrátu po jeho dlouhodobé inkubaci v půdním nadloží (Lousier 1982, Wanner *et al.* 2008). Totéž však lze říci i o rodu *Trinema*, jehož zástupci v mé práci během kultivace téměř vymizeli, ačkoliv na borovém opadu kultivovaném za stejných podmínek (byť kratší dobu) byly velice četné (Vohník *et al.* 2011).

Klíčovou otázkou této části práce bylo, zda je druhové složení společenstva krytenek ovlivněno hustotou mycelia na jehlicích. Ačkoliv předchozí studie ukázaly, že množství přítomného mycelia ovlivňuje druhové složení krytenek v půdním nadloží tropického lesa (Krashevskaja *et al.* 2008) či na substrátu kultivovaném v opadu (Wanner *et al.* 2008), v mé práci nebyl vliv mycelia na druhové složení společenstva krytenek na jehlicích průkazný (kap. 5.3, analýza RDA s kanonickou proměnnou „porostlost myceliem“).

Za neméně důležité jsem považovala zjistit, zda je některý z druhů krytenek na jehlicích asociován s myceliem. Žádný z přítomných druhů krytenek však nevykazoval větší afinitu k myceliu nežli ostatní druhy (kap. 5.3, X^2 -test homogeneity). Přitom o druzích *Euglypha strigosa* a *P. acropodia* je známo, že konzumují mimo jiné úlomky mycelia (Ogden *et Pitta* 1990, Gilbert *et al.* 2000), a dalo by se tedy očekávat, že budou mycelium na jehlicích vyhledávat. Druh *P. acropodia* byl navíc ve vlhkých komůrkách atrahován myceliem houby *Anavirga laxa* (Vohník *et al.* 2011), na jehlicích v mém pokusu však afinitu k myceliu neprojevil.

Nenalezla jsem tedy žádný vztah mezi krytenkami a myceliem na smrkových jehlicích. Příčiny a význam tohoto stavu diskutuji níže (kap. 6.7).

6.4. Krytenky v opadu tří druhů jehličnanů

První otázkou, kterou jsem si v této části kladla, bylo, které druhy krytenek kolonizují filtrační papír vlhkých komůrek. Pouze tři druhy krytenek (*A. muscorum*, *P. acropodia*, *A. discoides*) ve významném počtu sestupovaly na filtrační papír z jehlic tří druhů jehličnanů (kap. 5.2, Tab. 10), ačkoliv jen na smrkových jehlicích z týchž komůrek se po kultivaci vyskytovalo 11 druhů krytenek (Tab. 11). Druhy *A. muscorum* a *P. acropodia* byly jako jedny z mála krytenek přítomných v dubovém opadu schopny ve vysokých počtech kolonizovat celulóзовou membránu uloženou v opadových

sáčcích (Wanner *et al.* 2008), úspěšně také kolonizovaly půdu poškozenou požárem (Coûteaux 1977). Druh *P. acropodia* byl rovněž jedním ze silných kolonizátorů humusu prosté půdy užitě při rekultivaci, ačkoliv při kolonizaci sterilního opadu v téže lokalitě byl méně úspěšný (Wanner *et al.* 2005). Vohník *et al.* (2011) shledali, že tento druh je schopen kolonizovat filtrační papír vlhkých komůrek výrazně lépe než ostatní krytenky. Na základě všech těchto údajů se domnívám, že *P. acropodia* a pravděpodobně i *A. muscorum* jsou druhy přizpůsobenými k osídlování nových, živinami chudých biotopů. Rovněž *E. rotunda* úspěšně kolonizovala celulóзовou membránu v opadových sáčcích (Wanner *et al.* 2008), půdu po požáru (Coûteaux 1977) a jako jedna z prvních krytenek i humusu prostou půdu užitou při rekultivaci (Wanner *et al.* 2002, Wanner *et al.* 2005), nicméně při kultivaci borového opadu ve vlhkých komůrkách na filtrační papír neseřtopovala (Vohník *et al.* 2011), podobně jako tomu bylo v mé práci – ačkoliv na jehlicích došlo během kultivace k jejímu značnému nárůstu (kap. 5.3). Oproti tomu krytenka *A. discoïdes* sestupovala na filtrační papír vlhkých komůrek z opadu všech tří druhů jehličnanů. Tento druh je typický spíše pro rašeliniště (Lousier 1975, Tolonen *et al.* 1992, Lamentowicz *et al.* 2005), nicméně byl nalezen také v zamokřených půdách (Bamfort 1971) a v opadu tropického horského lesa (Krashevskaja 2008); nevyskytuje se však v žádné z mě známých prací z opadu jehličnanů (Lousier 1975, Schönborn 1975, Rauenbusch 1987, Wanner 1991, Schröter 2001, Vohník *et al.* 2011). Morfologie schránky tohoto druhu – silně zplořtělá schránka s ventrálním postavením pseudostomatu – je ovšem typická pro druhy žijící ve vysychavém prostředí (Rauenbusch 1987, Nikolaev *et al.* 2005). Protože jednotlivé druhy krytenek mohou dynamicky reagovat na obsah vody v prostředí (Laminger 1978, Schröter 2001), je možné, že se tento druh krytenky v opadu vyskytuje jen v malých počtech (pravděpodobně encystovaných) jedinců, což vede k jeho přehlížení, a své stavy zvyšuje pouze při dlouhodobé vyšší úrovni vlhkosti, jako tomu bylo ve vlhkých komůrkách.

Dále mě zajímalo, zda jsou počty krytenek ve vlhkých komůrkách ovlivněny druhem jehličnanu. Testy v rámci zobecněných lineárních modelů potvrdily význam druhu jehličnanu pro četnost krytenek *A. discoïdes* a *P. acropodia*. Oba druhy krytenek spolu s druhem *A. muscorum* dosáhly při kultivaci nejvyšších četností ve smrkovém opadu (Obr. 6), ačkoliv se jednalo o jehlice s nejnižší frekvencí sporulace hub (Tab. 7). Zůstává otázkou, zda počet krytenek ve vlhkých komůrkách odráží původní stav v opadu jehličnanů; jediná mě známá studie srovnávající četnost krytenek v různých druzích jehličnatého lesa pochází z Kanady, kde byly krytenky početnější v opadu i nižších vrstvách půdního profilu v borovém lese nežli ve smrkovém (Lousier 1975). S výjimkou *A. muscorum* byly krytenky četnější v komůrkách z Klánovického lesa nežli z Českého Švýcarska, což poněkud kontrastuje s nižší druhovou diverzitou hub v první lokalitě. Absenci *A. discoïdes* na modřínovém a borovém opadu z Českého Švýcarska si vysvětluji sušším prostředím těchto na skalách umístěných stanovišť v kontrastu se stabilně vlhkým prostředím Klánovického lesa a podmáčené smrčiny ve Vlčí soutěsce. Pro ostatní pokusy a pozorování v elektronovém mikroskopu jsem vybrala smrkový opad z Klánovického lesa.

Klíčovými otázkami této části práce ovšem bylo, zda je distribuce krytenek ve vlhkých komůrkách ovlivněna přítomností mycelia či spor hub a zda závisí na přítomnosti některého z nalezených druhů hub. Odpovědi jsem zjišťovala s využitím zobecněných lineárních modelů.

Výskyt krytenky *P. acropodia* na filtračním papíře pozitivně koreloval s množstvím pigmentovaného mycelia, podobně jako v případě tlustostěnného melanizovaného mycelia *Anavirga laxa* v práci Vohníka *et al.* (2011). Potravou *P. acropodia* jsou bakterie, spory a úlomky mycelia hub (Ogden *et Pitta* 1990). Ačkoliv krytenky z čeledí Hyalosphaenidae a Diffflugidae a také druh *Euglypha strigossa* dokážou konzumovat kořist větší než ony samy tak, že si ji posunují do pseudostomatu a postupně ji rozkládají, nebo tak, že penetrují její schránku či buněčnou stěnu (Hoogenraad *et de Groot* 1941, Yates *et Foissner* 1995, Gilbert *et al.* 2000), u druhu *P. acropodia* nebylo dle dostupných údajů podobné chování dosud pozorováno. Naopak mycelium *A. laxa* obklopené ve vlhkých komůrkách krytenkami *P. acropodia* jimi nebylo viditelně poškozováno (Vohník *et al.* 2011). Nicméně spory přítomné na jehlicích a filtračním papíře v mnou zkoumané sestavě dat byly v naprosté většině případů konidie druhů *Desmazierella acicola*, *Pezizomycotina* sp. 1 a *Cladosporium* spp., tj. objekty s průměrem okolo 5 μm, tedy výrazně menším, nežli pseudostoma *P. acropodia* (20-35 μm). Přesto však nebyla distribuce této krytenky přítomností spor ovlivněna. Získaná data tedy podporují hypotézu Vohníka *et al.* (2011), že důvodem atrakce *P. acropodia* k myceliu ve vlhkých komůrkách je spíše konzumace bakterií žijících v okolí hyf anebo myceliálních exsudátů nežli mykofagie.

Naopak distribuce *A. muscorum* ve vlhkých komůrkách byla pozitivně ovlivněna přítomností jak hyalinního mycelia, tak spor hub. Není mi známa žádná práce uvádějící potravní zvyky některého ze zástupců rodu *Assulina*, Schröter (2001) nicméně pro potřeby rozboru potravní sítě v opadu řadí *A. muscorum* mezi druhy panfytofágní, tj. živící se bakteriemi, houbami a detritem. Protože rozměry pseudostomatu umožňují *A. muscorum* konzumaci spor výše zmíněných druhů hub, lze předpokládat, že důvodem vyšších četností tohoto druhu za přítomnosti spor byla právě mykofagie. Důvody atrakce k myceliu mohou být stejné, jako v případě *P. acropodia*; dalším možným vysvětlením je, že se tato krytenka živí úlomky jemného hyalinního mycelia.

Rozmístění druhu *A. discoides* na filtračním papíře nebylo průkazně ovlivněno ani myceliem, ani přítomností spor jakožto souhrnné kategorie; tato krytenka však byla pozitivně asociována se sporujícími zástupci rodu *Cladosporium*. Lze předpokládat, že *A. discoides* je plurivorní, tak jako jiné druhy téhož rodu, živící se bakteriemi, nálevníky, bičíkovci či řasami, ale i kvasinkami a úlomky mycelia (Deflandre 1928, Laybourn *et Whymant* 1980, Torres *et Jebram* 1993). Je pravděpodobné, že spory rodu *Cladosporium* byly potravou *A. discoides*; jsou mnohem menší nežli průměr pseudostomatu této krytenky. Tento rod hub je ostatně pro svou vysokou produkci spor a nízkou antimikrobiální aktivitu také vyhledávaným zdrojem potravy pancířníků (Schneider *et Maraun* 2005, Koukol *et al.* 2009) a chvostoskoků (Sadaka-Laulan *et al.* 1998).

Distribuce dvou druhů krytenek byla tedy pozitivně ovlivněna přítomností mycelia na filtračním papíře vlhkých komůrek, jeden druh byl atrahován sporami hub. Pouze jeden druh krytenky

byl průkazně ovlivněn přítomností konkrétního taxonu houby. Význam uvedených zjištění bude diskutován níže (kap. 6.7).

6.5. Kultivace krytenky *A. discoides* s živým a mrtvým myceliem

Pro bližší pochopení interakcí krytenek a hub v opadu bylo potřebné zjistit, zda je vztah krytenek k myceliu ovlivněn fyziologickým stavem hyf a tím, ke kterému druhu houby náleží. Při výběru potravy jsou krytenky selektivní vůči jednotlivým taxonům organismů (Ogden *et* Pitta 1990, Meisterfeld *et al.* 1992, Gilbert *et al.* 2000, 2003), ačkoliv je jen málo známo o tom, jakou roli hraje fyziologický stav kořisti. V případě bičíkatých prvoků a mikroskopických mnohobuněčných živočichů konzumují krytenky obvykle mrtvé či umírající jedince, důvodem je však patrně pouze menší rychlost pohybu krytenek oproti těmto organismům, neboť přisedle žijící prvoky pohlcují krytenky zaživa (Gilbert *et al.* 2000, 2003). O konzumaci mycelia nejsou v tomto směru dostupné žádné údaje, protože však dosud nebylo pozorováno narušování ucelených hyf krytenkami, lze usuzovat, že pro mykofágní krytenky bude mít větší atraktivitu spíše odumřelé, poškozené mycelium, jehož úlomky mohou pohltnout. Naopak živé mycelium může aktivně ovlivňovat společenstva mikroorganismů vylučováním myceliálních exsudátů (Napolitano *et* Flanagan 1981, de Boer *et al.* 2005), jak ostatně dokládají pokusy s ektomykorhizními houbami (Ingham *et* Massicote 1994, Timonen *et al.* 1998, 2004, Heinonsalo *et al.* 2001). Tyto studie indikují, že nejen odlišné složení myceliálních exsudátů jednotlivých druhů hub, ale i odlišné složení společenstva bakterií vázaných na tyto exsudáty hraje úlohu v interakcích hub a prvoků (Timonen *et al.* 1998, 2004, Ingham *et* Massicote 1994).

Provedený pokus s krytenkou *A. discoides* a živým a usmrceným myceliem tří druhů hub (kap. 5.6) přinesl jasnou odpověď na otázku, zda je rozmístění krytenek ve vlhkých komůrkách ovlivněno druhem a fyziologickým stavem mycelia. Testy v rámci logistické regrese potvrdily průkazný vliv obou faktorů na četnost kontaktu krytenek s myceliem; část krytenek, zpočátku pokusu umístěných mimo mycelium, se do deseti dnů přesunula k živému i mrtvému myceliu, krytenky byly ovšem atrahovány více živým nežli mrtvým myceliem (Tab. 17). Jelikož se krytenky v tomto experimentu nerozmnožovaly, nebylo možné zjistit vliv stavu a druhu mycelia na jejich četnost; krytenky se nicméně rozmnožovaly v komůrkách kontaminovaných ve větší míře bakteriemi. Protože krytenky mohou využívat k vyhledávání kořisti chemotaxi (Gilbert *et al.* 2000), je možné, že jedinci *A. discoides* byly atrahovány jak látkami uvolněnými z odumřelého mycelia, tak především myceliálními exsudáty živých hub. Hyfy a myceliální exsudáty však zřejmě pro tento druh krytenky nejsou dostatečným zdrojem potravy (jak již bylo diskutováno v kap. 6.1), proto se tyto krytenky přestaly pohybovat a pravděpodobně se zacystovaly (neboť v dodatečném pokusu se po přenesení do živinami bohatšího prostředí opět rozmnožovaly). Ve světle publikovaných údajů (Napolitano *et* Flanagan 1981, Ingham *et* Massicote 1994, Timonen *et al.* 1998, 2004, Gilbert *et al.* 2000, Heinonsalo *et al.* 2001, de Boer *et al.* 2005) lze pak výsledky mého pokusu interpretovat tak, že krytenky jsou ve

vlhkých komůrkách ve své výživě závislé na přítomnosti bakterií a spor hub, přičemž k jejich vyhledávání využívají mimo jiné myceliálních exsudátů.

6.6. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií

a autotrofních organismů

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda jsou četnosti krytenek ve vlhkých komůrkách ovlivněny přítomností bakterií a autotrofních organismů. Vyhodnotit jsem mohla pouze četnosti druhu *P. acropodia*; testy v rámci zobecněných lineárních modelů nepotvrdily vliv žádného z faktorů. Vzhledem k omezením uvedeným výše (kap. 6.1) však nelze tento výsledek interpretovat tak, že by sledovaný druh krytenky nebyl asociován s bakteriemi. Na rozdíl od experimentu s jehlicemi tří druhů jehličnanů (kap. 5.2) se v tomto případě nepotvrdila asociace krytenky *P. acropodia* s myceliem; tento rozpor přičítám především nízké variabilitě množství mycelia v nyní hodnocených komůrkách (množství mycelia mezi pěti jehlicemi v komůrce se většinou lišilo pouze o jeden stupeň).

6.7. Vztah krytenek a hub v opadu – souhrnná diskuse

První hypotéza, již jsem se ve své práci snažila ověřit, zní: „Houby z opadu jehličnanů ovlivňují prostorovou distribuci krytenek, a to jak v laboratorních podmínkách, tak na přirozeném substrátu.“ Získaná data potvrzují uvedenou hypotézu jen zčásti, průkazný vliv hub jsem našla jen v experimentálních systémech. Krytenka *P. acropodia* byla průkazně atrahována pigmentovaným myceliem přítomným na filtračním papíře vlhkých komůrek (podobně jako v práci Vohníka *et al.* (2011)) a výskyt druhu *A. muscorum* ve vlhkých komůrkách byl průkazně spjat s přítomností spor hub a hyalinního mycelia; navíc v pokusu s živým a usmrčeným myceliem se krytenky *A. discoides* přesunuly k myceliu, a to především u živých hub. Nicméně, na smrkových jehlicích nebyly tyto druhy, ani žádný jiný druh krytenky, asociovány s myceliem. Na jehlicích také nebyl zjištěn vliv množství mycelia na druhové složení společenstva krytenek. Příčinu tohoto rozporu si vysvětlují odlišnými ekologickými podmínkami na jehlicích a na filtračním papíře – zatímco povrch jehlice je osídlen širokým spektrem organismů, jejichž vliv na jedince krytenek se může mísit a překrývat, filtrační papír vlhkých komůrek je živinami chudé prostředí, kolonizované přednostně myceliem, jež sem dokáže transportovat potřebné látky z jehlice; ostatní organismy jsou pak závislé na jeho exsudátech. Toto vysvětlení odpovídá pozorování Vohníka *et al.* (2011), kteří našli druhově i početně bohatší společenstvo krytenek na filtračním papíře vlhkých komůrek kolonizovaným myceliem nežli na papíře bez mycelia, a také výsledkům Wannera *et al.* (2008), v jejichž pokuse s kolonizací celulóзовé membrány umístěné v dubovém opadu byly četnosti některých druhů krytenek zpočátku pozitivně korelovány s myceliem, v pokročilejším stádiu sukcese však nikoliv. Souhrnně lze tedy říci, že v přirozeném, komplexním prostředí je sice vliv hub na společenstvo krytenek těžko odlišitelný od vlivu dalších činitelů, je však zřetelný při osidlování nového substrátu, kde přítomnost mycelia podporuje kolonizaci krytenkami.

Má druhá výchozí hypotéza se týká postaty vztahu krytenek a hub v opadu: „Krytenky v opadu konzumují spory a mycelia hub, myceliální exsudáty a bakterie asociované s myceliem.“ Získaná data podporují pouze konzumaci spor a bakterií. Distribuce jedinců *A. muscorum* ve vlhkých komůrkách průkazně korelovala s přítomností spor hub – což je zřejmě prvním signálem svědčícím pro existenci mykofagie u tohoto druhu krytenky – a rozmístění jedinců *A. discoides* bylo průkazně ovlivněno přítomností sporulujících jedinců rodu *Cladosporium*. Naopak na distribuci druhu *P. acropodia*, běžně označovaného za mykofágní (Coûteaux 1985, Ogden *et* Pitta 1990, Krashevskaya *et al.* 2008), neměla přítomnost spor vliv. Krytenky *A. muscorum* a *P. acropodia* byly ve vlhkých komůrkách průkazně atrahovány myceliem, rovněž jedinci *A. discoides* se v pokusu s živým a mrtvým myceliem přesunuly k myceliu. Tento pokus však ukázal, že na rozdíl od bakterií nejsou hyfy a myceliální exsudáty dostatečným zdrojem potravy pro krytenku *A. discoides*, ačkoliv myceliální exsudáty patrně zesilují její atrakci k myceliu. Podobně Vohník *et al.* (2011) prokázali atrakci krytenky *P. acropodia* myceliem *A. laxa*, avšak nepozorovali žádné známky konzumace hyf. Lze tedy shrnout, že spíše než hyfy a myceliální exsudáty jsou potravou krytenek v opadu bakterie a spory hub, avšak myceliální exsudáty mohou sloužit krytenkám k vyhledávání organismů asociovaných s hyfami.

Poslední zkoumanou hypotézou je: „Krytenky mají odlišný vztah k různým druhům hub v opadu.“ Získaná data potvrdila platnost hypotézy u druhu *A. discoides*. Tento druh měl průkazně odlišnou afinitu k myceliu tří různých druhů hub, ve vlhkých komůrkách byl také průkazně asociován se sporulujícími zástupci rodu *Cladosporium*, nikoliv s přítomností spor obecně. Je však nutno si povšimnout, že další dva druhy krytenek, *P. acropodia* a *A. muscorum*, ve vlhkých komůrkách nebyly asociovány s žádným konkrétním taxonem hub, ačkoliv byly asociovány s myceliem a v druhém případě i se sporami hub. To značí, že zatímco krytenka *A. discoides* má potravní preference jak při výběru konzumovaných spor, tak při výběru mycelia (přestože v tomto případě jí za potravu slouží s ním asociované mikroorganismy), druhy *P. acropodia* a *A. muscorum* jsou méně selektivní.

Ukazuje se, že interakce krytenek se saprotrofními houbami v opadu jehličnanů mohou být velice rozmanité – od prosté konzumace spor, přes konzumaci mikroorganismů asociovaných s myceliem až po vyhledávání kořisti prostřednictvím detekce myceliálních exsudátů. Protože jsou však krytenky půdními ekology spíše opomíjeny, nezbyvá, než se spolu s Davidem Wilkinsonem (2008) zeptat: „Co dalšího u této pro většinu biologů neznámé skupiny organismů čeká na své objevení?“

7. ZÁVĚR

- Ve vlhkých komůrkách jsem našla 28 druhů hub (v převážné většině mikroskopických vřecovýtusých hub); na jehlicích borovice lesní převládaly druhy *Desmazierella acicola* a *Sympodiella acicola*, na jehlicích modřinu opadavého druh *Alternaria alternata* a rod *Cladosporium*, na jehlicích smrku ztepilého druh *Marasmius androsaceus*.
- Na smrkových jehlicích jsem našla 21 druhů krytenek, převážně z řádu Euglyphida. Na jehlicích z terénu byly nejčtenější rody *Euglyph*a, *Corythion* a *Trinema*; během kultivace převládly druhy *Phryganella acropodia*, *Euglyph*a *rotunda* a *Assulina muscorum* a naopak vymizel rod *Trinema*.
- Druhové složení společenstva krytenek na smrkových jehlicích nebylo ovlivněno množstvím mycelia a žádný z druhů krytenek nebyl na jehlicích asociován s myceliem.
- Pouze tři druhy krytenek kolonizovaly ve větším počtu filtrační papír vlhkých komůrek: kolonizaci chudých biotopů přizpůsobené druhy *A. muscorum* a *P. acropodia* a typicky rašeliništní druh *Arcella discoides*; tyto krytenky byly nejčtenější ve smrkovém opadu.
- Distribuce krytenky *P. acropodia* ve vlhkých komůrkách byla pozitivně ovlivněna přítomností melanizovaného mycelia na filtračním papíře, distribuce krytenky *A. muscorum* byla spjata s výskytem hyalinního mycelia a spor hub. Distribuce krytenky *A. discoides* ve vlhkých komůrkách byla pozitivně ovlivněna přítomností sporulujících zástupců rodu *Cladosporium*.
- Krytenka *A. discoides* vyhledávala živé i usmrcené mycelium tří druhů hub, více však byla přitahována živým myceliem. Atraktivita mycelia tří druhů hub se rovněž lišila.
- Zatímco spory hub v opadu mohou být zdrojem potravy krytenek, pravděpodobným důvodem vyhledávání mycelia krytenkami je konzumace mikroorganismů živících se myceliálními exsudáty; přítomnost mycelia tak krytenkám usnadňuje kolonizaci nových substrátů.
- Myceliální exsudáty mohou krytenkám sloužit k vyhledávání potravy.
- Krytenky *P. acropodia* a *A. muscorum* jsou ve vztahu k houbám patrně méně selektivní, nežli *A. discoides*.

8. LITERATURA

- Aescht E., Foissner W. (1992): Effects of Mineral and Organic Fertilizers on the Microfauna in a High-Altitude Reafforestation. – *Trial Biol Fertil Soils* 13: 17–24.
- Aoki Y. (2003): Accurate enumeration and identification of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) in forest soil using scanning electron microscopy. – *J Microbl Methods* 55: 791–795.
- Aoki Y., Hoshino M., Matsubara T. (2007): Silica and testate amoebae in a soil under pine-oak forest. – *Geoderma* 142: 29–35.
- Baldrian P. (2006): Fungal laccases – occurrence and properties. – *FEMS Microb Rev* 30: 215–242.
- Bamforth S. S. (1971): The Numbers and Proportions of Testacea and Ciliates in Litters and Soils. – *J Protozool* 18: 24–28.
- Bass D., Moreira D., López-García P., Polet S., Chao E. E., von der Heyden S., Pawlowski J., Cavalier-Smith T. (2005): Polyubiquitin Insertions and the Phylogeny of Cercozoa and Rhizaria. – *Protist* 156:149–161.
- Bengtsson G., Erlandsson A., Rundgren S. (1988):Fungal odour attracts soil Collembola. – *Soil Biol Biochem* 20: 25–30.
- Boberg J. (2009): Litter Decomposing Fungi in Boreal Forests. Their Function in Carbon and Nitrogen Circulation. – Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sverige, 67 str.
- Boer W. de, Folman L., Summerbell R., Boddy L. (2005): Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. – *FEMS Microb Rev* 29: 795–811.
- Bonkowski M., Jentschke G., Scheu S. (2001): Contrasting effects of microbial partners in the rhizosphere: interactions between Norway Spruce seedlings(*Picea abies* Karst.), mykorrhiza (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.) and naked amoebae (Protozoa). – *Appl Soil Ecol* 18:193–204.
- Bonnet L. (1964): Le peuplement thécamoebien des sols. – *Rev Ecol Biol Sol* 1: 123–408.
- Braak C. J. F. ter, Šmilauer P. (2002): CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). – Microcomputer Power, Ithaca NY, USA, 500 str.
- Burke R. M., Cairney J. W. G. (2002): Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. – *Mycorrhiza* 12: 105–116.
- Cairney J. W. G. (2005): Basidiomycete mycelia in forest soils : dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. – *Mycol Res* 109: 7–20.
- Cavalier-Smith T., Chao E.-Y. (2003): Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). – *Protist* 154: 341–358.
- Chakraborty S. (1983): Mycophagous amoebae in a suppressive pasture soil in relation to the take-all disease of wheat. – Ph.D. Thesis, Department of Plant Pathology, Waite Agricultural Research Institute, The University of Adelaide, Australia, 184 str.
- Chakraborty S., Theodorou C., Bowen G. D. (1985): The reduction of root colonization by mycorrhizal fungi by mycophagous amoebae. – *Can J Microb* 31:295–297.
- Clarke C. J. (2003): Guide to the Identification of Soil Protozoa – Testate amoebae. – Centre for Ecology and Hydrobiology Windermere *et* Freshwater Biological Association, Cumbria, UK, 40 str.
- Coûteaux M.-M. (1977): Reconstitution d'une nouvelle communauté Thécamoebienne dans la litière d'une forêt incendiée en région subméditerranéenne. – *Ecol Bull (Stockholm)* 25: 102–108.
- Coûteaux M.-M. (1985): Relationships between testate amoebae and fungi in humus microcosms. – *Soil Biol Biochem* 17: 339–345.
- Coûteaux M.-M., Munsch A., Ponge J. F. (1979): Le genre *Euglypha*: Essai de taxinomie numérique. – *Protistologica* 15: 565–579.
- Crous P. W., Braun U., Schubert K., Groenewald J. Z. (2007): The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. – *Studies in mycology* 58, CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 253 str.

- Crous P. W., Robert V. (2008): Are we losing the battle in describing fungal biodiversity? – *Persoonia* 21: 167.
- Deflandre G. (1928): Le genre *Arcella* Ehrenberg. Morphologie-Biologie. Essai phylogénétique et systématique. – *Arch Protistenk* 64: 152–287.
- Deflandre G. (1936): Etude monographique sur le genre *Nebela* Leidy (Rhizopoda -Testacea). – *Ann Protistol* 5: 201–322.
- Ekelund F., Rønn R. (1994): Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. – *FEMS Microb Rev* 15: 321–353.
- Ellis M. B. (1971): Dematiaceous Hyphomycetes. – Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, 608 str.
- Ellis M. B. (1976): More Dematiaceous Hyphomycetes. – Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, 507 str.
- Finlay B. J., Esteban G. F., Fenchel T. (2004): Protist diversity is different? – *Protist* 155: 15–22.
- Foissner W. (2006): Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. – *Acta Protozool* 45: 111–136.
- Gilbert D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.-J. (1998a): The microbial loop at the surface of a peatland: structure, function, and impact of nutrient input. – *Microb Ecol* 35: 83–93.
- Gilbert D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.-J. (1998b): Shortterm effect of nitrogen enrichment on the microbial communities of a peatland. – *Hydrobiologia* 373–374: 111–119.
- Gilbert D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.-J., Mitchell E. A. D. (2000): Le régime alimentaire des Thécamoebiens (Protista, Sarcodina). – *Année Biol* 39: 57–68.
- Gilbert D., Mitchell E. A. D., Amblard C., Bourdier G., Francez A.-J. (2003): Population dynamics and food preferences of the testate amoeba *Nebela tincta major-bohemica-collaris* complex (Protozoa) in a *Sphagnum* peatland. – *Acta Protozool* 42: 99–104.
- Goubière F., van Maanen A., Debouzie D. (2001): Associations between three fungi on pine needles and their variation along a climatic gradient. – *Mycol Res* 105: 1101–1109.
- Grihnut T., Hadar Y., Chen Y. (2007): Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. – *Fung Biol Rev* 21: 179–189.
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. – *Palaeontol Electronica* 4: 9.
- Hausmann K., Hülsmann N. (2003): Protozoologie. – Překlad a doplnění J. Lom, Academia, Praha, ČR, 347 str.
- Hayes A. (1965): Studies on the decomposition of coniferous leaf litter. II. Changes in external features and succession of microfungi. – *Europ J Soil Science* 16: 242–257.
- Hedley R. H., Ogden C. G. (1973): Biology and fine structure of *Euglypha rotunda* (Testacea: Protozoa). – *Bull Br Mus nat Hist (Zool)* 25: 121–137, pls. i–vii.
- Hedley R. H., Ogden C. G., Mordan N. S. (1976): Manganese in the shell of *Centropyxis* (Rhizopoda: Protozoa). – *Cell Tiss Res* 171: 543–549.
- Heger T. J., Mitchell E. A. D., Todorov M., Golemanski V., Lara E., Leander B. S., Pawlowski J. (2010): Molecular phylogeny of euglyphid testate amoebae (Cercozoa: Euglyphida) suggests transitions between marine supralittoral and freshwater/terrestrial environments are infrequent. – *Mol Phylogenet Evol* 55: 113–122.
- Heger T. J., Pawlowski J., Lara E., Leander B. S., Todorov M., Golemanski V., Mitchell E. A. D. (2011): Comparing Potential COI and SSU rDNA Barcodes for Assessing the Diversity and Phylogenetic Relationships of Cyphoderiid Testate Amoebae (Rhizaria: Euglyphida). – *Protist* 162: 131–141.
- Heinonsalo J., Kirsten S. J. Ö., 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 Microb Ecol* 36: 73–84.
- Hoogenraad H. R., de Groot A.A. (1941) Observations on a special manner of feeding of a species of *Diffugia* (*Diffugia rubescens* Penard). – *Proc Ned Akad Wet* 44: 3–14.

- Ingham E. R., Massicotte H. B. (1994): Protozoan communities around conifer roots colonized by ectomycorrhizal fungi. – *Mycorrhiza* 5: 53–61.
- Jentschke G., Bonkowski M., Godbold D. L., Scheu S. (1995): Soil protozoa and forest tree growth: non nutritional effects and interaction with mycorrhizae. – *Biol Fert Soil* 20: 263–269.
- Kampichler Ch., Rolschewska J., Donnelly P. D., Boddy L. (2004): Collembolan grazing affects the growth strategy of the cord-forming fungus *Hypholoma fasciculare*. – *Soil Biol Biochem* 36: 591–599.
- Kendrick W., Burges A. (1962): Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. – *Nova Hedwigia* 4: 313–342.
- Klironomos J. D., Widden P., Deslandes I. (1992): Feeding preferences of the collembolan *Folsomia candida* in relation to microfungus successions on decaying litter. – *Soil Biol Biochem* 24: 685–692.
- Kolářová Z. (2009): Diverzita a funkce mikroskopických hub v opadu jehličnatých dřevin. – Bakalářská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, ČR, 22 str.
- Korkama-Rajala T., Müller M., Pennanen T. (2008): Decomposition and fungi of needle litter from slow- and fast-growing Norway spruce (*Picea abies*) clones. – *Microb Ecol* 56: 76–89.
- Koukol O. (2007): Effect of *Pinus strobus* L. invasion on the mycoflora of pine litter needles in the Bohemian Switzerland National Park (Czech Republic). – In: Härtel H. *et al* (eds.): Sandstone landscapes. Academia, Praha, ČR, str. 229–233.
- Koukol O., Gryndler M., Novák F., Vosátka M. (2004): Effect of *Chalara longipes* on decomposition of humic acids from *Picea abies* needle litter. – *Folia Microbiologica* 49: 574–578.
- Krashevskaya V. (2008): Diversity and community structure of testate amoebae (Protista) in tropical montane rain forests of southern Ecuador: altitudinal gradient, aboveground habitats and nutrient limitation. – Ph.D. Thesis, Technischen Universität Darmstadt, Deutschland, 90 str.
- Krashevskaya V., Bonkowski M., Maraun M., Ruess L., Kandeler E., Scheu S. (2008): Microorganisms as driving factors for the community structure of testate amoebae along an altitudinal transect in tropical mountain rain forests. – *Soil Biol Biochem* 40: 2427–2433.
- Lamentowicz M., Mitchell E. A. D. (2005): The Ecology of Testate Amoebae (Protists) in *Sphagnum* in North-Western Poland in Relation to Peatland Ecology. – *Microb Ecol* 50: 48–63.
- Laming H. (1978): The Effects of Soil Moisture Fluctuations on the Testacean Species *Trinema enchelys* (Ehrenberg) Leidy in a High Mountain Brown-earths-podsol and its Feeding Behaviour. – *Arch Protistenk* 120: 446–454.
- Lara E., Heger T. J., Ekelund F., Lamentowicz M., Mitchell E. A. D. (2008): Ribosomal RNA Genes Challenge the Monophyly of the Hyalospheniidae (Amoebozoa: Arcellinida). – *Protist* 159: 165–176.
- Lara E., Heger T. J., Mitchell E. A. D. (2009): Pseudocryptic speciation and long-range migration in the euglyphid testate amoeba genus *Assulina*. – 5th International Symposium on Testate Amoebae, 14-17 September 2009, Monbéliard, France – Program and abstracts, str. 35
- Lara E., Heger T. J., Mitchell E. A. D., Meisterfeld R., Ekelund F. (2007): SSU rRNA Reveals a Sequential Increase in Shell Complexity Among the Euglyphid Testate Amoebae (Rhizaria: Euglyphida). – *Protist* 158:229–237.1
- Laybourn J., Whyman L. (1980): The Effect of Diet and Temperature on Reproductive Rate in *Arcella vulgaris* Ehrenberg (Sarcodina: Testacida). – *Oecologia* 45: 282–284.
- Leidy J. (1879): Fresh-water Rhizopoda of North America. – Government Printing Office, Washington, DC, USA, 324 str.
- Lindahl B., Boberg J. (2008): Distribution and function of litter Basidiomycetes in coniferous forests. – *Br Mycol Soc Symp Series* 28:183–196.
- Lindahl B., Ihrmark K., Boberg J., Trumbore S. E., Höglberg P., Stenlid J., Finlay R. D. (2007): Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. – *New Phytologist* 173: 611–620.

- Lindahl B., Taylor A., Finlay R. (2002): Defining nutritional constraints on carbon cycling in boreal forests – towards a less ‘phytocentric perspective’ perspective. – *Plant and Soil* 242: 123–135.
- Lousier J. D. (1975) Relationships between distribution of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) and the soil habitat. *Naturaliste Can* 102: 57–72.
- Lousier J. D. (1982): Colonization of decomposing deciduous leaf litter by Testacea (Protozoa, Rhizopoda): Species succession, abundance, and biomass. – *Oecologia* 52: 381–388.
- Lousier J. D., Parkinson D. (1981): The disappearance of the empty test of litter-testate and soil-testate amebas (Testacea, Rhizopoda, Protozoa). – *Arch Protistenk* 124: 312–336.
- Lousier J. D., Parkinson D. (1984): Annual population dynamics and production ecology of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) in an aspen woodland soil. – *Soil Biol Biochem* 16: 103–114.
- Maanen A. van, Gourbière F. (1997): Host and geographical distribution of *Verticicladium trifidum*, *Thysanophora penicilliodes*, and similar fungi on decaying coniferous needles. – *Can J Bot* 75: 699–710.
- Matsushima (1975): *Icones microfungorum: A Matsushima lectorum*. – Matsushima, Kobe, Japan, 209 str.
- Meisterfeld R., Dohmen C., Meyer A., Panfil C., Weinand R. (1992): Influence of food quality and quantity on growth and feeding rates of testate amoebae (Testacealobosia). – *Europ J Protistol* 28: 351.
- Meisterfeld R., Heisterbaum M. (1986): The decay of empty tests of testate amoebae (Rhizopoda, Protozoa). – *Symp Biol Hung* 33: 285–290.
- Meisterfeld R., Mitchell E. A. D. (2008a): Arcellinida Kent 1880. Testate Lobose Amoebae. Version 02 September 2008 (under construction). – <http://tolweb.org/Arcellinida/124471/2008.09.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- Meisterfeld R., Mitchell E. A. D. (2008b): *Diffflugia* Leclerc 1815. Version 02 September 2008 (under construction). – <http://tolweb.org/Difflugia/124487/2008.09.02> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- Mitchell E. A. D., Meisterfeld R. (2005): Taxonomic confusion blurs the debate on cosmopolitanism versus local endemism of free-living protists. *Protist* 156: 263–267.
- Mitchell E. A. D., Payne R. J., Lamentowicz M. (2008): Potential implications of differential preservation of testate amoeba shells for paleoenvironmental reconstruction in peatlands. – *J Paleolimnol* 40: 603–618.
- Napolitano J. J., Flanagan V. D. (1981): Occurrence of Amoebae In and Around the Mushroom *Laccaria trullisata*. – *J Protozool* 28: 494–497.
- Netzel H. (1976): Die Abscheidung der Gehäusewand bei *Centropyxis discoides* (Rhizopoda, Testacea). – *Arch Protistenk* 118: 53–91, pls. v–xxi.
- Netzel H. (1977): Die Struktur des Plättchen-Gehäuses von *Euglypha rotunda*. – *Arch Protistenk* 119: 191–216.
- Netzel H. (1979): Morphogenesis in testaceous amoeba. – *Europ J Cell Biol* 20: 117.
- Nikolaev S. I., Berney C., Fahrni J., Bolivar I., Polet S., Mylnikov A. P., Aleshin V. V., Petrov N. B., Pawlowski J. (2004): The twilight of Heliozoa and rise of Rhizaria, an emerging supergroup of amoeboid eukaryotes. – *PNAS* 101:8066–8071.
- Nikolaev S. I., Mitchell E. A. D., Petrov N. B., Berney C., Fahrni J., Pawlowski J. (2005): The Testate Lobose Amoebae (Order Arcellinida Kent, 1880) Finally Find their Home within Amoebozoa. – *Protist* 156: 191–202.
- Nilsson R. H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K.-H., Larsson K., Kõljalg U. (2006): Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. – *PLoS ONE* 1: e59.
- O'Brien H. E., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J. M., Vilgalys R. (2005): Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. – *Appl Environ Microb* 71: 5544–5550.
- Ogden C. G. (1984): Shell structure of some testate amoebae from Britain (Rhizopoda, Protozoa). – *J Nat Hist* 18:341–362.

- Ogden C. G. (1991): Gas vacuoles and flotation in the testate amoeba *Arcella discoides*. – J Protozool 38: 269–270.
- Ogden C. G., Hedley R. H. (1980): An atlas of freshwater testate amoebae. – Oxford University Press, Oxford, UK, 222 str.
- Ogden C. G., Pitta P. (1989): Morphology and Construction of the Shell Wall in an Agglutinate Soil Testate Amoeba *Phryganella acropodia* (Rhizopoda). – J Protozool 36: 437–445.
- Ogden C. G., Pitta P. (1990): Biology and ultrastructure of the mycophagous, soil testate amoeba, *Phryganella acropodia* (Rhizopoda, Protozoa). – Biol Fertil Soils 9: 101–109.
- Osono T. (2007): Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. – Ecol Res 22: 955–974.
- Osono T., Fukasawa Y., Takeda H. (2003): Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition. – Mycologia 95: 820–826.
- Peach M. (1955): Soil fungi that prey on protozoa. – In: McKevan, K. (ed.): Soil Zoology. – Proceedings of the University of Nottingham Second Easter School in Agricultural Science, Butterworths Scientific Publications, London, str. 302–310.
- Ponge J. (1991): Succession of fungi and fauna during decomposition of needles in a small area of Scots pine litter. – Plant and Soil 138: 99–113.
- Przybył K., Karolewski P., Oleksyn J., Łabedzki A., Reich P. (2008): Fungal diversity of Norway spruce litter: Effects of site conditions and premature leaf fall caused by bark beetle outbreak. – Microb Ecol 56: 332–340.
- Rauenbusch K. (1987): Biologie und Feinstruktur (REM-Untersuchungen) terrestrischer Testaceen in Waldböden (Rhizopoda, Protozoa). – Arch Protistenk 134: 191–294.
- Renker C., Otto P., Schneider K., Zimdars B., Maraun M., Buscot F. (2005): Oribatid Mites as Potential Vectors for Soil Microfungi: Study of Mite-Associated Fungal Species. – Microb Ecol 50: 518–528.
- Sadaka-Laulana N., Ponge J.-F., Roquebert M.-F., Buryd E., Boumezzough A. (1998): Feeding preferences of the collembolan *Onychiurus sinensis* for fungi colonizing holm oak litter (*Quercus rotundifolia* Lam.). – Europ J Soil Biol 34: 179–188.
- Schneider K., Maraun M. (2005): Feeding preferences among dark pigmented fungal taxa (“Dematiacea”) indicate limited trophic niche differentiation of oribatid mites (Oribatida, Acari). – Pedobiologia 49: 61–67.
- Schneider K., Renker C., Scheu S., Maraun M. (2005) Oribatid mite (Oribatida, Acari) feeding on ectomycorrhizal fungi. – Mycorrhiza 16: 67–72.
- Schönborn W. (1975): Ermittlung der Jahresproduktion von Boden-Protozoen. I. Euglyphidae (Rhizopoda, Testacea). – Pedobiologia 15: 415–424.
- Schönborn W. (1978): Untersuchungen zur Produktion der Boden-Testaceen. – Pedobiologia 18: 373–377.
- Schröter D. (2001): Structure and function of the decomposer food webs of forests along a European North-South-transect with special focus on Testate Amoebae (Protozoa). – Ph.D. Thesis, Department of Animal Ecology, University Giessen, Deutschland, 137 str.
- Seifert K. A. (2008): Integrating DNA Barcoding into the Mycological Sciences. – Persoonia 21: 162–166.
- Simpson A. G., Roger A. J. (2004): The real 'kingdoms' of eukaryotes. – Curr Biol 14: R693–R696.
- Smirnov A., Nassonova E., Berney C., Fahrni J., Bolivar I., Pawlowski J. (2005): Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae. – Protist 156: 129–142.
- Smith H. G., Bobrov A., Lara E. (2008): Diversity and biogeography of testate amoebae. – Biodivers Conserv 17: 329–343.
- Steffen K. T., Hatakka A., Hofrichter M. (2002): Degradation of Humic Acids by the Litter-Decomposing Basidiomycete *Collybia dryophila*. – Appl Environ Microb 68: 3442–3448.
- Tekle Y. I., Granta J., Anderson O. R., Nerad T. A., Coleb J. C., Patterson D. J., Katz L. A. (2008): Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within ‘Amoebozoa’ upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. – Mol Phylogenet Evol: 47: 339–352.

- Timonen S., Christensen S., Ekelund F. (2004): Distribution of protozoa in scots pine mycorrhizospheres. – *Soil Biol Biochem* 36:1087–1093.
- Timonen S., Jørgensen K. S., Haahtela K., Sen R. (1998): Bacterial community structure of Scots pine-*Suillus bovinus* and *Paxillus involutus* mycorrhizospheres in dry pine forest soil and nursery peat. – *Can J Microb* 44: 499–513.
- Todorov M. (2001): Testate amoeba (Protozoa: Rhizopoda) in soil and litter of beech forests (*Fagus sylvatica* L.) from Bulgaria. – *Acta Zool Bulg* 53: 19–36.
- Tokumasu S., Aoiki T. (2002): A new approach to studying microfungal succession on decaying pine needles in an oceanic subtropical region in Japan. – *Fung Divers* 10: 167–183.
- Tokumasu S., Aoiki T., Oberwinkler F. (1994): Fungal succession on pine needles in Germany. – *Mycoscience* 35: 29–37.
- Tolonen K., Warner B. G., Vasander H. (1992): Ecology of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) in Mires in Southern Finland. I. Autecology. – *Arch Protistenk* 142:119–138.
- Török J. K., Pollák B., Heger Z., Csikós G., Márialigeti K. (2008): First evidence of bacterial endocytobionts in the lobose testate amoeba *Arcella* (Amoebozoa, Arcellinida). – *Protistology* 5: 303–312.
- Torres V. S., Jebram D. H. A. (1993): *Arcella gibbosa microsoma* var n. (Protozoa: Sarcodina, Arcellinida) descrição e observações feitas em seu cultivo. – *Biotemas* 6: 20–29.
- Vohník M., Burdíková Z., Albrechtová J., Vosátka M. (2009): Testate Amoebae (Arcellinida and Euglyphida) vs. Ericoid Mycorrhizal and DSE Fungi: A Possible Novel Interaction in the Mycorrhizosphere of Ericaceous Plants? – *Microb Ecol* 57: 203–214.
- Vohník M., Burdíková Z., Vyhnal A., Koukol O. (2011): Interactions Between Testate Amoebae and Saprotrophic Microfungi in a Scots Pine Litter Microcosm. – *Microb Ecol*: 660–668.
- Wanner M. (1991): Zur Ökologie von Thekamöben (Protozoa: Rhizopoda) in süddeutschen Wäldern. – *Arch Protistenk* 140: 237–288.
- Wanner M., Dunger W. (2002): Primary immigration and succession of soil organisms on reclaimed opencast coal mining areas in eastern Germany. – *European Journal of Soil Biology* 38: 137–143.
- Wanner M., Elmer M., Kazda M., Xylander W. E. R. (2008): Community Assembly of Terrestrial Testate Amoebae: How is the Very First Beginning Characterized? – *Microb Ecol* 56: 43–54.
- Wanner M., Xylander W. E. R. (2005): Biodiversity development of terrestrial testate amoebae: is there any succession at all? – *Biol Fertil Soils* 41: 428–438.
- Widden P., Parkinson D. (1973): Fungi from Canadian coniferous forest soils. – *Can J Bot* 51: 2275–2290.
- Wilkinson D. M. (2009): Testate amoebae as model organisms for studying the biogeography of free-living microorganisms. – In: 5th International Symposium on Testate Amoebae – 14–17 September 2009, Monbéliard, France – Program and abstracts, str. 32.
- Wylezich C., Meisterfeld R., Meisterfeld S., Schlegel M. (2002): Phylogenetic Analyses of Small Subunit Ribosomal RNA Coding Regions Reveal a Monophyletic Lineage of Euglyphid Testate Amoebae (Order Euglyphida). – *J Eukaryot Microb* 49: 108–118.
- Yeates G. W., Foissner W. (1995): Testate amoebae as predators of nematodes. – *Biol Fertil Soils* 20: 1–7.

9. PŘÍLOHY – PRIMÁRNÍ DATA

9.1. Houby a krytenky na jehlicích kultivovaných ve vlhkých komůrkách

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) (kap. 4.2)

Délka jehlice (mm)	Komůrka B1								Komůrka B2							
	96	72	102	98	92	76	82	108	82	124	82	106	136	68	80	144
Pigmentované mycelium ¹	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Hyalinní mycelium ²																
Spory ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Druhy hub ⁴																
<i>Desmazierella acicola</i>						+	+		+		+	+			+	+
<i>Pezizomycotina</i> sp. 1	+	+	+	+	+		+	+							+	+
<i>Sympodiella acicola</i>	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	
Druhy krytenek ⁵																
<i>Arcella discooides</i>	10	2	2	2		1	1	8								
<i>Assulina muscorum</i>	300	150	210	190	160	300	120	220	60	500	500	170	170	400	30	350
<i>Phryganella acropodia</i>	240	150	90	90	60	200	140	90	150	120	350	150	130	120	230	60

Délka jehlice (mm)	Komůrka B3								Komůrka B5							
	90	92	72	84	80	118	54	86	104	106	84	46	86	40	160	76
Pigmentované mycelium ¹	2	3	2	2	1	3	2	2				1		3		1
Hyalinní mycelium ²		+								+		+			+	+
Spory ³	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+
Druhy hub ⁴																
<i>Acrodontium crateriforme</i>						+	+									
<i>Desmazierella acicola</i>			+		+		+	+						+		
<i>Oidiodendron</i> sp.																+
<i>Pezizomycotina</i> sp. 1	+		+		+	+		+								
<i>Sympodiella acicola</i>	+		+		+	+	+	+		+	+	+	+			+
Druhy krytenek ⁵																
<i>Arcella discooides</i>			2	5	1	18										
<i>Assulina muscorum</i>	31	90	270	450	50	110	18	14	41	100	400	400	150	160	250	80
<i>Phryganella acropodia</i>	200	170	200	130	130	120	70	150	130	70	800	50	18	15	100	80

Délka jehlice (mm)	Komůrka B6								Komůrka B7							
	92	52	70	98	96	84	92	74	70	60	92	98	84	72	80	61
Pigmentované mycelium ¹	2	3	3	3	3	1	1	2	3	3	3	3	2	1	1	
Hyalinní mycelium ²	+	+	+	+			+	+				+	+		+	+
Spory ³	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Druhy hub ⁴																
<i>Alternaria alternata</i>													+			
<i>Cladosporium herbarum</i>															+	
<i>Coniochaeta</i> sp.														+		
<i>Desmazierella acicola</i>						+	+		+			+				+
<i>Pezizomycotina</i> cf. <i>Taenionella</i>										+						
<i>Pezizomycotina</i> sp. 1		+	+	+											+	
<i>Pezizomycotina</i> sp. 4														+		
<i>Pezizomycotina</i> sp. 5										+						
<i>Sordaria</i> spp.												+	+	+		
<i>Sympodiella acicola</i>	+	+	+	+	+			+			+	+				
Druhy krytenek ⁵																
<i>Assulina muscorum</i>				1	55	80	8	3								
<i>Phryganella acropodia</i>	2			1		3	9	15								

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) – pokračování

Komůrka M1																																
Délka jehlice (mm)	25	17	16	18	26	15	20	17	21	20	18	19	20	21	16	20	22	20	17	21	23	16	17	18	14	18	18	14	16	18	19	18
Pigmentované mycelium ¹						1					1												1									
Hyalinní mycelium ²										+		+		+																		
Spory ³	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	
Druhy hub ⁴																																
<i>Alternaria alternata</i>																															+	
<i>Cladosporium herbarum</i>								+	+	+		+					+															
Pezizomycotina sp. 1	+		+	+	+	+	+	+	+			+		+	+		+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+		+	
Druhy krytenek ⁵																																
<i>Arcella discoides</i>	9	1	1	3	10	7	10	4	11	5	3	3	2			2	2			1	4		1	5		2	2			3	1	
<i>Assulina muscorum</i>	13	4	1	2	4	13	73	14	66	90	40	26	25	5	3	5	50	16	6		4		12	12	1	71	4	9	6	5	19	15
<i>Phryganella acropodia</i>	60	31	28	66	71	37	73	9	43	73	60	48	60	40	50	60	50	30	30	28	27	22	40	35	20	30	50	50	60	30	20	20

Komůrka M2																																
Délka jehlice (mm)	16	13	20	15	19	14	21	20	18	15	15	18	13	15	12	13	16	14	19	20	10	17	15	20	14	15	15	16	15	14	18	14
Pigmentované mycelium ¹						1	1		1	1		1		1	1			1	1			2	2		1		2	2			2	
Hyalinní mycelium ²		+					+																									
Spory ³		+	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
Druhy hub ⁴																																
<i>Alternaria alternata</i>							+	+				+	+												+	+					+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>																											+			+	+	+
<i>Cladosporium spp.</i>		+																						+				+				
Pezizomycotina sp. 1		+		+		+		+	+		+		+		+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+		+	
Pezizomycotina sp. 5														+																		
<i>Sympodiella acicola</i>			+			+																										
Druhy krytenek ⁵																																
<i>Arcella discoides</i>	1	1		4							1		4	2	5	2	4	1	3		2	3			2	1	3	4	5	1		
<i>Assulina muscorum</i>							55																									11
<i>Cyclopyxis kahli</i>	4	1																														
<i>Phryganella acropodia</i>	6	1	1	4	1	14	8	39	14	3	7	6	17	22	48	64	78	80	100	40	50	28	23	34	25	52	38	50	40	60	40	

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) – pokračování

Komůrka M3		14	20	12	20	18	16	16	21	19	17	19	18	18	18	16	14	18	18	17	20	13	15	20	12	17	20	16	17	13	15	20	17		
Délka jehlice (mm)																																			
Pigmentované mycelium ¹			2						1	1					1		1	1			1		1		1		1						1		
Hyalinní mycelium ²							+		+																										
Spory ³		+	+		+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+					+		
Druhy hub ⁴																																			
<i>Alternaria alternata</i>		+	+		+						+	+												+	+	+									
<i>Cladosporium cladosporioides</i>													+			+	+					+													
<i>Cladosporium herbarum</i>										+																									
<i>Cladosporium spp.</i>		+				+								+				+										+						+	
<i>Epicoccum nigrum</i>			+																							+									
Pezizomycotina sp. 1		+				+		+	+			+	+				+		+	+			+				+							+	
Druhy krytenek ⁵																																			
<i>Arcella discoides</i>					2								1	1	1	1									2								2		
<i>Assulina muscorum</i>		20	30	100	120	110	100	40	50	5		5	20	29						18		1	4	21		19	60	1					1		
<i>Phryganella acropodia</i>		8	9	9	3	23	27	51	20	30	35	40	20	6	13	12			9	3	4	6				8	6	27	24	18	12	17	10		

Komůrka M5		17	28	26	18	16	19	14	21	19	20	19	20	21	15	20	11	18	17	21	18	14	16	15	20	
Délka jehlice (mm)																										
Pigmentované mycelium ¹		2	1					3	3								3		3							
Hyalinní mycelium ²																				+		+			+	
Spory ³		+				+											+					+				
Druhy hub ⁴																										
<i>Desmazierella acicola</i>		+																								
Pezizomycotina sp. 1		+																				+				
<i>Torula herbarum</i>						+											+									
Druhy krytenek ⁵																										
<i>Phryganella acropodia</i>		57	180	110	76	85	130	130	120	90	60	50	55	50	60	50	21	4	36	42	80	90	50	60	100	

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) – pokračování

Komůrka M6																								
Délka jehlice (mm)	29	19	15	19	17	18	18	21	15	15	21	22	17	18	17	17	13	26	13	21	22	15	27	29
Pigmentované mycelium ¹						1		2		1		3	3	2		3	1	1	1		2	1		1
Hyalinní mycelium ²					+																			
Spory ³	+	+		+	+											+	+	+	+	+	+			
Druhy hub ⁴																								
<i>Alternaria alternata</i>					+	+										+	+	+		+	+			
<i>Sordaria</i> spp.	+	+			+													+	+	+	+			

Komůrka M7																								
Délka jehlice (mm)	23	19	25	33	32	33	23	22	34	29	29	24	27	22	39	21	35	31	23	19	19	20	28	23
Pigmentované mycelium ¹			1	1			1	1		3						2								2
Hyalinní mycelium ²																								
Spory ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Druhy hub ⁴																								
<i>Alternaria alternata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>												+					+							
<i>Epicoccum nigrum</i>					+					+				+			+							
<i>Marasmius androsaceus</i>																							+	+
<i>Neoscytalidium dimidiantum</i>						+																		
Pezizomycotina sp. 5										+														
<i>Sympodiella acicola</i>				+		+																		

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) – pokračování

Komůrka S1

Délka jehlice (mm)	13	10	10	10	18	14	16	15	13	12	10	14	10	17	13	13	9	10	13	13	13	14	16	12	11	15	11	10	11	13	13	14			
Pigmentované mycelium ¹	2	1	1		2		1					1								2	2	3			1		2		3						
Hyalinní mycelium ²					+		+			+	+			+		+	+			+															
Spory ³	+	+				+			+			+		+							+				+				+						
Druhy hub ⁴																																			
<i>Alternaria alternata</i>						+			+			+																							
<i>Desmazierella acicola</i>														+							+														
Pezizomycotina sp. 1	+	+							+																+					+					
Druhy krytenek ⁵																																			
<i>Arcella discoides</i>	3		1	4	8	5	43	49	16	34	17	25	9	12	7	4	3	2		1		1	7	6	19	30	25	6	5	5	1	8			
<i>Assulina muscorum</i>	28	3	42	70	70	55	100	14	16			60	25	3			26	3	3	28	70	150	90	34	40	60	50	35	23	40	50	200			
<i>Phryganella acropodia</i>	80	130	90	60	60	70	80	100	80	120	70	60	50	32	38	37	24	59	52	70	70	90	170	70	60	160	100	50	50	40	40	130			

Komůrka S2

Délka jehlice (mm)	13	12	10	12	13	13	14	11	10	9	14	13	12	15	12	15	11	9	16	12	13	15	13	16	14									
Pigmentované mycelium ¹	2	3	1	1	3	1		1	3	1	1	3				1	3			3	3	1	3	3	2	2								
Hyalinní mycelium ²					+				+											+														
Spory ³			+		+				+				+					+	+	+														
Druhy hub ⁴																																		
<i>Alternaria alternata</i>			+		+																													
<i>Chalara</i> sp.														+																				
<i>Desmazierella acicola</i>			+																															
Pezizomycotina sp. 1						+			+									+	+	+														
Druhy krytenek ⁵																																		
<i>Arcella discoides</i>	150	10		1		2	2			2	1	3		1	2	1	3			3		2		4	4									
<i>Assulina muscorum</i>							22		70	110	4				8				45	3	1	2												
<i>Phryganella acropodia</i>	130	150	180	130	270	90	110	60	100	60	150	200	130	10	130	180	100	130	220	250	250	200	130	140	160									

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) – pokračování

Komůrka S5	14	11	13	14	13	16	14	18	14	11	14	13	12	10	9	13	11	13	11	15	18	16	21	27	22	15	16	13	11	12	10			
Délka jehlice (mm)																																		
Pigmentované mycelium ¹		1		1	1											1	1																	
Hyalinní mycelium ²				+			+										+	+																
Spory ³		+		+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Druhy hub ⁴																																		
<i>Acrodontium crateriforme</i>												+																						
<i>Alternaria alternata</i>																														+				
<i>Chaetosphaeria preussii</i>		+																																
<i>Chalara longipes</i>																														+				
<i>Cladosporium cladosporioides</i>																			+															
<i>Cladosporium spp.</i>												+																						
<i>Marasmius androsaceus</i>						+	+	+	+	+	+	+				+	+							+	+									
Mucorales				+					+	+		+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+		
<i>Penicillium sp.</i> (sekc Biverticillium)																+																		
Pezizomycotina sp. 1										+																								
Pezizomycotina sp. 2								+			+				+																			
<i>Sordaria spp.</i>				+																														
<i>Trichoderma spp.</i>																+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Zalerion arboricola</i>				+															+															
Druhy krytenek ⁵																																		
<i>Arcella discoides</i>											2																							
<i>Assulina muscorum</i>																								2										
<i>Phryganella acropodia</i>				1																														

Komůrka S6	12	19	18	15	15	15	12	19	21	18	16	12	8	12	17	16	20	16	12	13	17	15	17	10	14	15	15	14	11	15	12	14			
Délka jehlice (mm)																																			
Pigmentované mycelium ¹		3																									2								
Hyalinní mycelium ²																																			
Spory ³	+															+							+												
Druhy hub ⁴																																			
<i>Chalara longipes</i>																								+											
<i>Marasmius androsaceus</i>	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+		+	+	+	
Mucorales	+																																		
Pezizomycotina sp. 3																	+							+											

Výskyt hub a četnosti krytenek v okolí jednotlivých jehlic borovice lesní (B), modřínu opadavého (M) a smrku ztepilého (S) – pokračování

Komůrka S3

Délka jehlice (mm)	12	14	11	11	12	14	15	12	10	11	12	13	11	12	14	19	19	15	11	12	18	10	11	14	8	14	10	16	10	17	13	14
Pigmentované mycelium ¹	3		1	3	1	2	3	3						3	3	3	1		1			3	1	3			3	3			2	
Hyalinní mycelium ²	+				+					+												+										
Spory ³						+				+		+		+	+		+						+							+		
Druhy hub ⁴																																
<i>Desmazierella acicola</i>										+		+											+									
Pezizomycotina sp. 1						+					+		+	+			+						+									
Pezizomycotina sp. 2																															+	
Pezizomycotina sp. 6																													+			
<i>Scolecobasidium</i> sp.						+																										
Druhy krytenek ⁵																																
<i>Arcella discoides</i>										4	45	9	3			2	14	21	2	1						3	5	2	2	7		
<i>Assulina muscorum</i>						1			23	40	60	120	600	900	160	70	30		40						7	11	30	18	2	30	40	
<i>Phryganella acropodia</i>	180	60	140	130	130	110	150	140	90	60	100	80	50	31	40	90	50	200	90	90	100	90	110	150	200	260	200	180	120	100	100	140

Komůrka S7

Délka jehlice (mm)	17	13	17	15	13	14	15	15	19	12	17	19	20	18	23	14	17	11	14	11	19	15	18	20	14	21	12	11	13	17	15	18
Pigmentované mycelium ¹			1																													
Hyalinní mycelium ²				+		+				+	+	+		+	+	+	+	+		+									+			+
Spory ³		+			+															+	+											+
Druhy hub ⁴																																
<i>Marasmius androsaceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mucorales					+																+		+									+
Pezizomycotina sp. 2		+																	+													
Druhy krytenek ⁵																																
<i>Assulina muscorum</i>	60	2	7	11	9	13	5	30	17	36	19	160	420	1000	2500	2000	2000	2000	2000	2000	110	90	180	70	9	8	220	210	1100	1100	140	500
<i>Corythium dubium</i>	8																															
<i>Phryganella acropodia</i>	8	2																														

¹ Číslo označuje množství mycelia na filtračním papíře v okolí jehlice (1 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě menší než 1 hyfa na 1 mm jehlice, 2 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě 1–5 hyf na 1 mm jehlice, 3 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě větší než 5 hyf na 1 mm jehlice), prázdné pole znamená, že na filtračním papíře nebylo žádné viditelné mycelium.

² + označuje přítomnost hyalinního mycelia na filtračním papíře v okolí jehlice, prázdné pole jeho nepřítomnost.

³ + označuje přítomnost spor některého z níže uvedených taxonů hub na jehlici nebo filtračním papíře v okolí jehlice, prázdné pole jejich nepřítomnost.

⁴ + označuje přítomnost daného druhu houby na jehlici, prázdné pole jeho nepřítomnost.

⁵ Číslo udává počet jedinců daného druhu krytenky na filtračním papíře v okolí jehlice, prázdné pole znamená, že krytenky nebyly na filtračním papíře v okolí jehlice přítomny.

9.2. Krytenky na jehlicích smrku ztepilého pozorovaných ve skenovacím elektronovém mikroskopu

Krytenky na 12 nekultivovaných jehlicích (kap. 4.3)

Taxony krytenek	Počty jedinců na jednotlivých jehlicích ¹											
<i>Arcella sp.</i>	/1											
<i>Assulina muscorum</i>	/1 1/ 1/ 2/ 1/ 1/ 5/											
<i>Corythion dubium</i>	2/3	1/1	1/2	/1	1/			1/2	1/	7/1		
<i>Diffflugia minutissima</i>	/1											
<i>Euglypha acanthophora</i>	/1											
<i>Euglypha ciliata</i>	2/1		/1			2/						
<i>Euglypha compressa</i>	1/	1/2	/2	/1	1/	1/	1/1	3/	3/1	/1	1/1	
<i>Euglypha rotunda</i>	2/ 2/1 4/											
<i>Euglypha strigosa</i>	2/	1/	1/			2/1	/1	3/2	2/2	6/1		
<i>Euglypha tuberculata</i>	1/											
<i>Euglypha sp.</i>	2/1	1/	/1			1/	2/					
<i>Nebela collaris</i>	1/											
<i>Nebela tinctoria</i>	/1											
<i>Nebela sp.</i>	1/											
<i>Phryganella acropodia</i>	1/	1/1	/1			1/	1/	1/				
<i>Placocista spinosa</i>	/1											
<i>Pseudodiffflugia gracialis</i>	1/											
<i>Tracheleuglypha dentata</i>	/1											
<i>Trinema complanatum</i>	6/	1/3	/1	/1			1/	2/6	1/	/2	1/1	3/
<i>Trinema enchelys</i>	1/	/1			1/1	/1						
<i>Trinema lineare</i>	/1		/1	/2	2/1			1/1		1/1		
<i>Trinema sp.</i>	3/2		2/									
porostlost jehlic myceliem ²	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3

¹ Číslo před lomítkem udává počet jedinců, kteří byli v kontaktu s myceliem, číslo za lomítkem počet jedinců bez kontaktu s myceliem, prázdné pole znamená nepřítomnost daného taxonu krytenek na jehlici.

² Číslo označuje množství mycelia jehlici (1 – do 33%, 2 – 34–66%, 3 – nad 67%).

Krytenky na 12 jehlicích po osmi měsících kultivace ve vlhkých komůrkách (kap. 4.3)

Taxony krytenek	Počty jedinců na jednotlivých jehlicích ¹ (jedinci v kontaktu s myceliem/jedinci bez kontaktu s myceliem)											
<i>Arcella discoidea</i>	1/	3/1		2/1								
<i>Arcella sp.</i>	4/3		2/									
<i>Assulina muscorum</i>	9/7	2/3	32/31	2/1	16/11	15/8	/1	13/	76/11		18/2	
<i>Bullinularia indica</i>	1/											
<i>Centropryxis aerophila</i>	6/1		10/2	1/	6/4		3/		5/			
<i>Centropryxis sp.</i>	1/											
<i>Corythion dubium</i>	2/1		1/1	/1	/1			1/	17/3		1/	
<i>Diffflugia minutissima</i>	/3											
<i>Euglypha rotunda</i>	19/15		2/1	11/5	36/37			3/	135/24			
<i>Euglypha strigosa</i>	4/3			7/		3/1						
<i>Euglypha sp.</i>	4/		3/2									
<i>Nebela sp.</i>	2/1											
<i>Phryganella acropodia</i>	12/6	16/15	12/16	38/22	15/1	42/45	8/12	28/	48/	44/3	30/	16/
<i>Trinema complanatum</i>	/1											
porostlost jehlic myceliem ²	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3

¹ Číslo před lomítkem označuje počet jedinců, kteří byli v kontaktu s myceliem, číslo za lomítkem počet jedinců bez kontaktu s myceliem, prázdné pole znamená nepřítomnost daného taxonu krytenek na jehlici.

² Číslo označuje množství mycelia jehlici (1 – do 33%, 2 – 34–66%, 3 – nad 67%).

9.3. Odolnost krytenky *A. discoides* vůči antibiotikům

Rozmnožování *A. discoides* po ošetření antibiotiky (kap. 4.4.2)

Ošetření	Počty krytenek v Petriho miskách				
	počáteční	po 4 dnech	po 7 dnech	po 11 dnech	po 18 dnech
Penicilin G	9	9	8	11	17
	4	5	5	5	5
	5	7	8	9	13
Streptomycin-sulfát	6	9	9	9	9
	9	8	9	7	8
	7	7	8	7	8
Destilovaná voda	7	8	10	9	9
	12	16	16	23	20
	5	7	9	7	11

9.4. Kultivace krytenky *A. discoides* s živým a mrtvým myceliem

Četnost kontaktu *A. discoides* s živým a mrtvým myceliem tří druhů hub (kap. 4.5)

Druh houby	Stav mycelia	Počet krytenek v kontaktu s myceliem /bez kontaktu s myceliem ¹			Druh houby	Stav mycelia	Počet krytenek v kontaktu s myceliem /bez kontaktu s myceliem ¹		
		po 10 dnech	po 24 dnech	po 38 dnech			po 10 dnech	po 24 dnech	po 38 dnech
H1	živé	4/4	3/4	3/4	H3	živé	7/0	3/0	3/0
		4/6	0/8	0/0			8/0	8/0	8/0
		0/8	0/7	0/0			4/0	5/0	5/0
		6/1	6/2	6/2			8/0	8/0	8/0
		6/1	5/1	5/1			6/0	6/0	6/0
	mrtvé	1/7	0/7	1/5		mrtvé	8/0	6/0	6/0
		0/8	0/9	0/9			3/3	2/2	1/2
		6/1	3/6	3/6			6/0	6/0	6/0
		2/5	0/6	0/6			7/0	7/0	7/0
		5/3	3/4	3/4			7/0	7/0	7/0
H2 ²	živé	1/5	3/1	3/1	Sterilní jehlice	11	8	8	
		7/1	7/1	7/1		7	6	7	
		7/1	5/2	5/2		8	8	8	
		3/2	1/4	1/4		5	7	5	
		7/1	7/1	7/1		7	7	7	
	mrtvé	0/6	0/4	0/4					
		0/6	0/5	0/5					
		0/7	0/7	0/7					
		0/8	2/6	0/8					
		3/5	2/6	2/6					

¹ Na počátku pokusu bylo vloženo 8 jedinců, a to vždy mimo mycelium.

² *Herpotrichia juniperi*

Počty jedinců *A. discoides* v komůrkách s myceliem H2 (*Herpotrichia juniperi*) a se sterilními jehlicemi (kap. 4.5)

Stav mycelia	Počty krytenek	
	1. opakování ²	2. opakování ³
živé	19	10
	20	9
	20	0
	20	11
	20	0
	20	0
Sterilní jehlice	20	9
	11	41*
	20	0
	18	22*
	19	24*

¹ Po 22 dnech kultivace (na počátku pokusu bylo vloženo 20 jedinců).

² Po 34 dnech kultivace (na počátku pokusu bylo vloženo 10 jedinců).

* V těchto komůrkách se vyskytl bakteriální sliz.

9.5. Kultivace ve vlhkých komůrkách s omezením růstu bakterií a autotrofních organismů

Výskyt spor a mycelia a četnosti krytenek v okolí jehlic ve vlhkých komůrkách ve dvou světelných režimech a s nebo bez ošetření antibiotiky (kap. 4.6)

A) Střídavý světelný režim, bez ošetření antibiotiky

	komůrka Sv2					komůrka Sv5					komůrka Sv6					komůrka Sv7					komůrka Sv8				
Mycelium ¹	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	1	1		2	3	2	2	1	1	1	1	1	2	1
Spory ²		+		+		+		+	+	+	+	+	+	+	+		+		+		+	+	+	+	+
<i>Phryganella acropodia</i> ³						138	131	89	172	166	154	106	238	189	174	154	161	144	83	61					

	komůrka Sv9					komůrka Sv13					komůrka Sv14					komůrka Sv15					komůrka Sv16				
Mycelium ¹	3	1	2	3	2	3	3	3	2	2	3	2	2	2	3	3	2	2	1	2	3	3	2	2	2
Spory ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Arcella discooides</i> ³	249	176	91	91	167	1	6	9	2																
<i>Phryganella acropodia</i> ³						1	18	89	1						119	116	68	78	180						
<i>Cyclopyxis kahli</i> ³																					3	32	25		

B) Střídavý světelný režim, s ošetřením antibiotiky

	komůrka Sv1					komůrka Sv3					komůrka Sv4					komůrka Sv10					komůrka Sv11				
Mycelium ¹	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	1	3	2	3
Spory ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+							+	+	+	+	+
<i>Arcella discooides</i> ³	1	34			1																				
<i>Phryganella acropodia</i> ³						185	77	99	122	104	108	91	96	123	73	133	42	73	40	114					

	komůrka Sv12					komůrka Sv17					komůrka Sv18					komůrka Sv19					komůrka Sv20				
Mycelium ¹	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	2	1	2	1	1	1	1
Spory ²	+	+	+	+	+						+	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+
<i>Phryganella acropodia</i> ³						136	166	94	68	64						50	103	38	173	79	106	153	223	152	31

Výskyt spor a mycelia a četnosti krytenek v okolí jehlic ve vlhkých komůrkách ve dvou světelných režimech a s nebo bez ošetření antibiotiky (pokračování)

C) Temnotní světelný režim, bez ošetření antibiotiky

	komůrka Tm4					komůrka Tm5				komůrka Tm7					komůrka Tm10					komůrka Tm11					
Mycelium ¹	3	1	2	3	1	3	2		1	1	3	2	1	1	2	3	3	1	1	2	2	1	2	2	1
Spory ²			+	+	+		+		+						+	+	+	+	+	+	+	+			+
<i>Phryganella acropodia</i> ³						198	158	109	61	44											226	32	29	227	93

	komůrka Tm12					komůrka Tm13				komůrka Tm16					komůrka Tm18					komůrka Tm20					
Mycelium ¹	1	1	2	2	2	3	2		2	2	1	1	1	1	1	3	2	1	2	1	3	2	1	2	1
Spory ²	+	+	+		+		+		+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Arcella discooides</i> ³																					3	24	2	1	9

D) Temnotní světelný režim, s ošetřením antibiotiky

	komůrka Tm1					komůrka Tm2					komůrka Tm2					komůrka Tm6					komůrka Tm8					
Mycelium	3	2	1	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	1	1	2	2	3	1	1	3	2	
Spory			+			+				+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		
<i>Phryganella acropodia</i>	126	56	41	35	78	74	33	108	111	262																
<i>Assulina muscorum</i>			2	306	13													14	166	10	1					

	komůrka Tm9					komůrka Tm14					komůrka Tm15					komůrka Tm17					komůrka Tm19				
Mycelium	3	3	3	3	2	3	3	3	2	1	2	1		1	2	3	1	2	3	2	3		2	3	2
Spory	+	+	+	+	+				+	+					+	+	+	+	+	+					+
<i>Arcella discooides</i>																6	4	2	3						
<i>Phryganella acropodia</i>																42	33	17	112	321					

¹ Číslo označuje množství mycelia na filtračním papíře v okolí jehlice (1 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě menší než 1 hyfa na 1 mm jehlice, 2 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě 1–5 hyf na 1 mm jehlice, 3 – mycelium vyrůstá z jehlice v hustotě větší než 5 hyf na 1 mm jehlice), prázdné pole znamená, že na filtračním papíře nebylo žádné viditelné mycelium.

² + označuje přítomnost spor hub na jehlici nebo filtračním papíře v okolí jehlice, prázdné pole jejich nepřítomnost.

³ Číslo udává počet jedinců daného druhu krytenky na filtračním papíře v okolí jehlice, prázdné pole znamená, že krytenky nebyly na filtračním papíře v okolí jehlice přítomny.