

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY

studijní program: Biologie
studijní obor: Botanika



Bc. Zuzana Kolářová

Charakteristika společenstva hub na opadu smrku
ztepilého kultivací a analýzou T-RFLP

*Characterization of fungal community in spruce (Picea abies) litter using
cultivation and T-RFLP*

Diplomová práce

školitel: Mgr. Ondřej Koukol, Ph. D.

Praha 2012

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 dne

.....

Zuzana Kolářová

Poděkování

Hlavní poděkování patří mému školiteli Ondřeji Koukolovi za to, že byl vždy ochoten reagovat na moje dotazy a za to že se mi snažil předat to nejlepší z jeho zkušeností. Druhý hlavní dík patří Petru Baldrianovi za možnost spolupráce, vstřícnost a veškerou pomoc s metodou T-RFLP. Dále bych chtěla poděkovat Janě Veselé a Tereze Konvalinkové za pomoc při zorientování ve statistickém zpracování dat a za čas, který mi věnovaly. Díky nim jsem se od mnoha dat posunula k výsledkům. Poděkování si zaslouží mnoho dalších kolegů a spolužáků z Katedry botaniky PřF UK a z Mikrobiologického ústavu AVČR, kteří mi různými radami usnadňovali zdárný postup v mé diplomové práci. Rodině a přáteli děkuji za podporu a za vše co pro mě dělají.

Práce byla financována grantem GAČR č. 526/08/0751.

Abstrakt

Houby mají důležitou funkci při dekompozici jehličnatého opadu a ovlivňují koloběhy živin v lesních ekosystémech. Proto je kladen velký důraz na prozkoumání diverzity těchto organismů.

Cílem této práce bylo popsat diverzitu hub smrkového opadu a vývoj tohoto společenstva v čase na lokalitách regenerujících po kůrovcovém poškození. Dalším cílem bylo porovnat lokality lišící se různou délkou tohoto poškození. Lokality byly vybrány v NP Šumava, kde byly instalovány opadové sáčky s jehličím, které se odebíraly v průběhu třech let. Diverzita hub a změny ve společenstvu byly zjišťovány dvěma metodami: kultivací jehlic na 2° sladinovém agaru a fingerprintovou metodou T-RFLP.

Kultivací jehlic na agarovém médiu bylo v průběhu tříleté sukcese získáno dohromady 71 druhů hub z obou lokalit. Pomocí T-RFLP bylo celkově zaznamenáno 122 různých fragmentů. Dominantními druhy byly *Scleroconidioma sphagnicola*, *Thysanophora penicillioides*, *Hormonema dematiodes*, *Ceuthospora pinastri*, druhy rodu *Chalara*, *Trichoderma polysporum*, *Mycena galopus* a blíže neurčený druh Helotiales sp. 1. Primární saprotrofové se ve společenstvu vyskytovaly hlavně prvních 8 měsíců, poté je začaly nahrazovat bazidiomycety.

Vliv různé délky kůrovcového poškození na druhové složení hub se prokázal jako signifikantní. Tyto rozdíly byly mnohem více patrné pro data z analýzy T-RFLP než pro data z kultivace. Zdá se, že kultivace nebyla schopná zachytit dostatečné množství druhů pro odlišení lokalit s různou délkou kůrovcového poškození.

Klíčová slova:

diverzita hub, sukcese hub, askomycety, bazidiomycety, kultivační metody, molekulární metody, horská smrčina, kůrovec

Abstract

Fungi have a key role in the decomposition of coniferous litter and affect nutrient cycling in forest ecosystems. Therefore, great emphasis is placed on exploring the diversity of these organisms.

The aim of this thesis was to describe fungal diversity in spruce litter and revealed temporal development of this community in a forest regenerating after bark beetle outbreak. Another objective was to compare sites with different length of bark beetle damage. The study area was located in the Bohemian Forest mountain range. Litter bags with spruce needles were placed on the forest soil and several samplings were performed in the course of three years. Diversity of fungi and changes in the fungal community were assessed by two methods: cultivation of needles on 2° MEA and fingerprinting method T-RFLP.

In total 71 fungal species were obtained from needles during a three-year succession by cultivation approach. Using T-RFLP 122 different fragments were generally recorded. The dominant species were *Scleroconidioma sphagnicola*, *Thysanophora penicillioides*, *Hormonema dematiodes*, *Ceuthospora pinastri*, species of genus *Chalara*, *Trichoderma polysporum*, *Mycena galopus* and unknown species Helotiales sp. 1. Primary saprotrophs occurred in the community mainly in first 8 months and then were replaced by basidiomycetes.

Influence of different lengths of bark beetle damage on the species composition of fungi was significant. These differences were much more obvious for T-RFLP data than for cultivation data. It appears that the cultivation was not able to detect a sufficient number of species for distinguishing sites with different lengths of bark beetle damage.

Key words:

fungal diversity, fungal succession, ascomycetes, basidiomycetes, cultivation methods, molecular methods, mountain spruce forest, bark beetle

OBSAH

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
2.1 Diverzita hub na opadu smrku.....	3
2.2 Sukcese hub na jehličnatém opadu.....	5
2.3 Ekosystém horské smrčiny v ČR.....	6
2.4 Mykologický výzkum na Šumavě.....	8
2.5 Kultivační přístup k zjištění diverzity hub.....	9
2.6 Molekulární přístup k zjištění diverzity hub.....	9
2.6.1 T-RFLP (terminal restriction length polymorphism).....	11
2.7 Seznam použitých zkratk.....	12
3 MATERIÁL A METODY.....	13
3.1 Studovaná lokalita a odběr vzorků.....	13
3.2 Kultivace jehlic, izolace kmenů a uchovávání kultur.....	16
3.3 Izolace DNA, PCR a sekvenování.....	18
3.4 Identifikace kmenů.....	19
3.5 Konstrukce fylogenetických stromů.....	20
3.6 T-RFLP.....	21
3.7 Statistické vyhodnocení a analýza diverzity.....	23
3.7.1 Shannonův index.....	23
3.7.2 Mnohorozměrné analýzy.....	23
4 VÝSLEDKY.....	25
4.1 Diverzita hub smrkového opadu v ekosystému po kůrovcové kalamitě – metodou kultivace.....	25
4.2 Diverzita hub smrkového opadu v ekosystému po kůrovcové kalamitě – metodou T-RFLP.....	32

4.3	Sukcese hub na smrkovém opadu v ekosystému poškozeném kůrovcem – metoda kultivace.....	37
4.4	Sukcese hub na smrkovém opadu v ekosystému poškozeném kůrovcem – metoda T-RFLP41	
5	DISKUZE	43
5.1	Metodika kultivace	43
5.2	Metodika T-RFLP.....	44
5.3	Kombinace metody kultivace a T-RFLP	46
5.4	Diverzita a sukcese hub smrkového opadu.....	46
5.5	Abundantní druhy	50
6	ZÁVĚR	53
7	LITERATURA	54
8	PŘÍLOHY	67

1 Úvod a cíle práce

Diverzita hub na živých i na odumřelých částech rodu *Picea* se věnuje ve světě poměrně velký zájem, jelikož spolu s dalšími jehličnany tvoří rozsáhlé lesy boreálního pásu severní polokoule (Lindahl *et al.* 2002). Jehličnatý opad je kvůli své kyselé povaze a nízkým hodnotám dusíku osidlován právě spíše houbami než bakteriálním společenstvím, které převažuje v ekosystémech bohatých na živiny, s vyšším pH (Baldrian *et al.* 2012, Allison *et al.* 2007, Nilsson *et al.* 2007). Nízké koncentrace dusíku a vysoké množství těžko rozložitelných látek také vedou v jehličnatých lesech k pomalé dekompozici a hromadění organické hmoty (Osono a Takeda 2006), proto tyto ekosystémy hrají významnou roli úložiště světových zásob uhlíku (Lindahl *et al.* 2002)

I přes množství studií, které pocházejí z boreálních a jim podobných ekosystémů, zůstávají stále mnohé otázky, související s reakcí houbového společenstva na změny prostředí, nezodpovězeny. V této diplomové práci jsem se zaměřila na specifický biotop druhu *Picea abies* – horskou smrčinu regenerující po kalamitě kůrovce a mým cílem bylo odpovědět na tyto otázky:

- 1) Jaká je diverzita houbového společenstva smrkového opadu v ekosystému regenerujícím po poškození kůrovcem?
- 2) Jak se toto společenstvo mění během sukcese?
- 3) Jak se liší lokality s různou délkou kůrovcového poškození?

K zjištění diverzity hub jsem použila dva odlišné přístupy, tradiční kultivaci substrátu na agaru a molekulární fingerprintovou metodu T-RFLP. Získaná data přispěla k řešení projektu č. 526/08/0751 Grantové agentury České republiky s názvem: Půdní procesy a mikrobiální společenstva se vztahem k cyklům C a N v průběhu regenerace horského lesa po kůrovcové kalamitě. Na projektu spolupracují MBÚ AVČR¹, JČU² a UK³. Kmeny hub izolované během diplomové práce a během pokusného odběru byly použity pro enzymatické pokusy (Žifčáková *et al.* 2011) a popis diverzity hub na jehlicích z padlých

¹Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky

²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

³Univerzita Karlova v Praze

kmenů smrku ztepilého (Koukol 2012). Z pokusného odběru také pochází nový druh pro vědu *Bactrodesmium gabretae* (Koukol a Kolářová 2010).

2 Literární přehled

2.1 Diverzita hub na opadu smrku

První mykologické záznamy diverzity hub v opadu smrkových porostů korespondují s průzkumem mikroskopických⁴ hub v půdě. Bohužel autoři těchto prací ne vždy rozlišovali jednotlivé horizonty půdy a metodika izolace hub se omezuje většinou na oplach substrátu a nanesení zředěné suspenze na agarové médium, což vede k zachycení hlavně dobře sporulujících hub.

Christensen a Whittingham (1965) studovali mikroskopické houby půdy močálů s jehličnany *Picea mariana* a *Larix laricina*. Dále byl proveden výzkum půdy smíšených lesních porostů s *P. mariana* a *P. glauca* (Morrall a Vanterpool 1968). Samostatně byl opad zpracován v práci Reddy a Knowles (1965) u druhu *P. mariana*, která sledovala lokality hnojené a nehnojeného močovinou. Počty kolonií některých hub na hnojených lokalitách klesaly, nicméně identifikace byla provedena maximálně do rodu. Na nehnojených lokalitách byly nejčtenější kolonie *Pullularia*⁵ spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. a kvasinky. Smrkovému opadu se věnoval také Hayes (1965). Sledoval sukcesi hub na jehlicích *P. sitchensis* v průběhu 16 měsíců a zaznamenal tak 19 druhů hub, které rozdělil na rané (např. *Haplographium penicilloides*⁶, *Penicillium frequentans*)⁷ a pozdní kolonizátory (např. *Trichoderma viride*, *Oidiodendron fuscum*⁸, *Verticicladium trifidum*) a na druhy přítomné konstantně (např. *Aposphaeria* spp., *Mucor hiemalis*).

Na druh *P. abies* se zaměřil již Schalin (1967), který zkoumal humusovou vrstvu lesní půdy. Ale až švédské studie ze 70. let minulého století (Söderström 1975, Söderström a Bååth 1978) zmiňují zjištěné druhy konkrétně pro opadovou vrstvu půdy lesa s *P. abies*. Söderström (1975) používal k zjištění diverzity hub na jehlicích v opadu sterilizaci oplachem a následnou kultivaci kousků jehlic na karboxymethylcelulóзовém agaru. Celková diverzita hub byla uvedena až v pozdějším článku (Söderström a Bååth 1978). Ze 100 fragmentů jehlic získal 424 kolonií hub patřících k 50 druhům, mezi nimiž dominoval

⁴ mikroskopické houby (mikromycety) = houby, které mají malé (mikroskopické) sporokarpy, což je obecný termín pro pohlavní i nepohlavní rozmnožovací struktury (Kirk *et al.* 2008)

⁵ *Pullularia* je synonymum pro několik dnešních rodů např. *Aureobasidium*, *Hormonema*, *Exophiala*

⁶ *Haplographium penicilloides* je synonymum současného jména *Thysanophora penicilloides*

⁷ *Penicillium frequentans* je synonymum současného jména *P. glabrum*

⁸ *Oidiodendron fuscum* je synonymum současného jména *O. tenuissimum* (www.indexfungorum.org)

rod *Mortierella* (např. *M. ramanniana*⁹, *M. parvispora*, *M. echinula*), rod *Trichoderma* (*T. polysporum* a *T. viride*), rod *Penicillium* (např. *P. brevi-compactum*, *P. daleae*) a druhy *Acremonium griseoviride* a *Candida* sp. Druh *Thysanophora penicillioides*, častý na smrkovém opadu (van Maanen a Gourbière 1997), byl přítomen jen v nízkém počtu. Metodicky odlišné pozorování provedli Livsey a Barklund (1992) při dlouhodobém zaznamenávání plodnic druhů *Lophodermium piceae* a *Rhizosphaera kalkhoffii* na čerstvě opadlých jehlicích. Výskyt těchto plodnic se měnil v závislosti na sezóně a *L. piceae* bylo podstatně četnější na lokalitě s vyšším úhrnem srážek.

Přechod endofytických hub z jehličí *P. abies* do role primárních kolonizátorů opadu sledoval Müller *et al.* (2001) inkubací zelených jehlic na smrkové půdě *in vitro* po dobu 5 měsíců. V jehlicích, které během této doby zhnědly, pak byla nejhojněji nalezena *Tiarosporella parca*, tři blíže neurčené izoláty a v menších počtech *Sclerophoma pythiophila*¹⁰ a *Lophodermium piceae*. Podobnou otázkou se zabývali Korkama-Rajala *et al.* (2008). Zelené jehlice věkové třídy 3 byly ponechány dekompozici v opadových sáčcích *in situ* a *in vitro* po dobu 2 let. Posléze byla z jehličí izolována DNA a RNA a k vizualizaci struktury komunity byla použita metoda DGGE a klonování. RNA ze vzorků kultivovaných *in situ* odhalila 22 taxonů, z nich nejčetnější byl rod *Lophodermium* (25%), neznámý druh z řádu Pezizales (18%), rody *Mycena*, *Marasmius*, *Sebacina* a *Rhizoctonia*. Při kultivaci *in vivo* byl počet taxonů získaných z RNA pouze 10. Nejvyšších četností dosáhly rody *Mollisia* (40%), *Lophodermium* (21%), *Lachnum* a *Phialocephala*. DNA byla klonována jen pro vzorky *in situ* a lišila se od výsledků z RNA hlavně vysokou dominancí rodu *Lophodermium* (65%).

Diverzita hub byla stanovena také u předčasně opadaných jehlic v důsledku poškození *P. abies* kůrovcem. K nejběžnějším houbám na těchto jehlicích patřily *Phomopsis occulta*, *Penicillium purpurogenum*, *P. janthinellum*, *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Hormonema dematioides*, *Alternaria alternata*, *Mucor zonatus* a několik sterilních kmenů (Przybył *et al.* 2008).

Mykologické studie se také často zaměřovaly na endofytické společenstvo jehlic rodu *Picea* (Müller a Hallaksela 1998, Müller a Hallaksela 2000, Müller *et al.* 2001, Stefani a Bérubé 2006, Sokolski *et al.* 2007, Korkama-Rajala *et al.* 2008, Koukol *et al.*

⁹ *Mortierella ramanniana* je synonymum pro současného jméno *Umbelopsis ramanniana*

¹⁰ *Sclerophoma pythiophila* je synonymum současného jména *Hormonema dematioides* (www.indexfungorum.org)

2012). Všechny tyto práce jsou vhodné k porovnání diverzity hub z opadu *P. abies*, jelikož se spektrum hub mezi druhy hostitele i mezi živými a odumřelými jehlicemi částečně překrývá.

Celkově se zdá být málo ucelených studií na diverzitu hub opadu smrku. Pokud výzkum srovnáme s druhým důležitým jehličnanem boreálních lesů – borovicí, tak je borovicový opad mnohem více prozkoumán (Koukol 2007).

2.2 Sukcese hub na jehličnatém opadu

Sukcese hub je chápána jako postupné využívání stejného substrátu myceliem různými druhy hub nebo jejich různými společenstvy (Frankland 1998). Tento typ sukcese označujeme jako degradační a její časový průběh je relativně krátký v řádu měsíců až několika let (Šálek *et al.* 2005). Během této doby různé skupiny hub zpřístupňují zdroj dalším skupinám hub, do doby než zanikne nebo přestane být pro houby atraktivní.

Sukcese hub na jehlicích je navozena současně s jejich přirozenou senescencí, kdy se mění jejich chemické složení a ztrácí tak svou přirozenou obranyschopnost (Schulz a Boyle 2005, Przybył *et al.* 2008). Zda dochází k nějaké sukcesi endofytního společenstva v průběhu vitálního stádia jehličí je dosud nevyřešenou otázkou (Koukol *et al.* 2012), přičemž je známo, že s věkem jehlice (listu) se diverzita endofytů zvyšuje (Lorenzi *et al.* 2006, Unterseher *et al.* 2007). Podobně jako u rostlin dělíme sukcesi na primární a sekundární, ale ne vždy se jedná o jednotný lineární proces, jelikož může být pozměněn i malými disturbancemi např. urychlení sekundární sukcese na spáleništích (Frankland 1998).

První společenstvo hub senescentních jehlic je tvořeno částečně endofyty a epifyty, kteří osídlili ještě živé jehlice na stromě (Osono 2006, Koukol *et al.* 2012). Po spadu na lesní půdu se na jehlice dostanou spory primárních saprotrofů, kteří využívají hlavně rozpustné sacharidy, další lehce rozložitelné látky a také celulózu. Následuje postupné prorůstání opadu myceliem sekundárních saprotrofů a dochází k dalšímu posunu v sukcesi, do které se zapojují již z velké části bazidiomycety, rozkládající celulózu, lignin a rekalcitrantní komplexní sloučeniny¹¹. Ve chvíli, kdy opad ztrácí svou celistvost, a je již

¹¹ Těžko rozložitelné komplexy polyfenolických (taniny, produkty dekompozice ligninu) a dusíkatých (chitin, proteiny) sloučenin (Lindhahl a Boberg 2008).

poměrně dobře rozložen, střídají saprotrofy mykorhizní druhy, které na rozdíl od saprotrofů netrpí nedostatkem uhlíkatých látek (Lindahl a Boberg 2008). Někteří autoři předpokládají, že potřeba specializovaného společenstva pro rozklad těžko degradovatelných zbytků jehlic způsobuje v konečné fázi dekompozice snížení diverzity hub (Müller *et al.* 2001, Dighton 2007).

První studie sukcese hub byly zaměřeny na časovou změnu, později se výzkum přesunul také na prostorovou škálu (Frankland 1998). Pro jehličnatý opad je známé ovlivnění druhové skladby sezónou (Tokumasu 1998), nadmořskou výškou i zeměpisnou šířkou, což souvisí s klimatickými podmínkami (van Maanen a Gourbière 1997, Gourbière *et al.* 2001, Osono 2007). Jehličí je vysoce fragmentovaný substrát, který nabízí houbám omezené jednotky živin, z tohoto důvodu a také kvůli kompetici někteří autoři předpokládali, že na jednotlivých jehlicích roste jen několik druhů z celkového společenstva hub. K tomuto předpokladu také napomáhala používaná metodika omezená na sledování konidioforů na povrchu jehlic (Gourbière *et al.* 1999). Tento fakt je v dnešní době již sporný. Například metodou RAMS bylo v jediné jehlici objeveno 34 jedinců druhu *Lophodermium piceae* (Müller *et al.* 2001).

Celý proces je v opadu ovlivňován také dalšími skupinami organismů, kteří se účastní dekompozice opadu tj. hlavně bakterie a půdní mikrofauna. Je také možné, že schopnost rozkládat určité substráty je běžně zastupitelná a sukcesí řídí spíše schopnost kompetice s jinými houbami (Žifčáková *et al.* 2011).

2.3 Ekosystém horské smrčiny v ČR

Původní horské smrčiny se vyskytují roztroušeně na našich nejvyšších pohořích např. NP Šumava, Krkonošský NP, CHKO Jeseníky, CHKO Beskydy, NPR Králický Sněžník (Neuhäuslová *et al.* 2001). Překryv areálu původních a obhospodařovaných lesů stěžuje jejich odlišení a možná i proto víme jen málo o jejich dynamice a regeneraci (Jonášová 2001, Svoboda 2007, Lustyk 2009). Na rozdíl od smrkových monokultur se původní smrčiny vyskytují až od submontánního stupně (Kučera 2010) a podmínkami je můžeme přirovnat k boreální tajze (Jonášová 2001). Na hřebenech hor v nadmořských výškách 1100-1350 m se setkáváme s podjednotkou horských třtinových smrčin (*Calamagrostio villosae-Piceetum*), které na vlhčích půdách střídají papratkové smrčiny (*Athyrio-alpestris-Piceon*), nebo eventuelně podmáčené smrčiny (*Mastigobryo-Piceetum*)

po obvodu horských vrchovišť. Tyto biotopy jsou ohrožovány průmyslovými emisemi a acidifikací půd, což vede k oslabování porostů a následné náchylnosti ke kalamitám hmyzích škůdců, poškození větrem, houbovými onemocněními nebo námrazou (Neuhäuslová *et al.* 2001, Kučera 2010).

Významnou oblastí z hlediska původních i hospodářských smrkových porostů je pohoří Šumava, jeden z největších lesních komplexů střední Evropy. Od 80. let minulého století tyto lesy čelí lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*), který se od roku 1995 explozivně šířil (Vacek *et al.* 2003). Další gradace následovala v roce 2003 a v roce 2007 k dalšímu poškození porostů přispěla kalamita větrná. Tyto disturbance ovšem nejsou v delším časovém měřítku ničím výjimečným a v minulosti k nim nejspíše docházelo v pravidelných intervalech (Janda 2010, Kindlemann *et al.* 2012), nicméně ekosystém to ovlivní na dlouhé roky.

Stromy poškozené kůrovcem shodí během krátkého času, v jediné sezóně, všechno jehličí. Dospělý smrk na poškozených lokalitách Šumavy tak přidá do ekosystému 50 – 60 kg sušiny jehličnatého opadu, tj. 18–20 t na hektar. Nenapadený smrkový les Krkonoš přitom ročně shodí pouze 1,7–3,1 t organické složky na hektar. V porovnání s čerstvě otrhaným jehličím z lokalit s prvními příznaky přítomnosti kůrovce mají přirozeně spadané jehlice nižší obsah dusíku a hořčíku a naopak vyšší obsah vápníku (Kovářová a Vacek 2003). Defoliace následně mrtvý les prosvětlí a zpřístupní sukcesi semenáčků a trav, naopak některé původní druhy např. mechorostů ustupují (Jonášová 2001, Jonášová a Prach 2004). Samozřejmě se tak změní mikroklimatické podmínky a stanoviště mohou být vystavena větším výkyvům teplot a vlhkosti, což má nepříznivý vliv i na houby (Holec 2000). Vzhledem k odumření stromů se naskytuje otázka, jakým způsobem to ovlivní mikrobiální společenstvo půdy (např. mykorhizní houby, Dighton a Mason 1985) nebo společenstvo opadu, které už není pravidelně zasypáváno novým jehličím. Také změny chemického složení jehlic mohou předurčovat jejich první kolonizátory (Przybył *et al.* 2008).

I přes náhlé a značné změny způsobené kůrovcovými kalamitami považují Prach a Jonášová (2004) tyto disturbance za „přirozený nástroj k obnově přirozeného charakteru horské smrčiny, která byla v minulosti pozměněna člověkem“. Autoři zaznamenali v přirozeně se obnovujícím lese po kůrovcové kalamitě vzrůstající poměr původních listnatých druhů jako je jeřáb (*Sorbus aucuparia*) a buk (*Fagus sylvatica*).

2.4 Mykologický výzkum na Šumavě

Šumava je mykofloristicky poměrně dobře prozkoumaná, ale zájem se soustředí především na makromycety¹² (resp. bazidiomycety) a průzkum je nerovnoměrný, upřednostňující lokality pro vědu maximálně atraktivní (Váňa 1996, Holec 2000). Mikromycety (resp. askomycety a zygomycety) se zabývali např. Kubátová *et al.* (1998), Prášil a Réblová (1998) nebo Nováková a Blažková (2000). K prozkoumání diverzity hub Šumavy významně přispěla studie Baldrian *et al.* (2012), která se zabývá složením mikrobiálního společenstva lesní půdy a vzhledem k čistě molekulárnímu přístupu zahrnuje všechny skupiny hub.

Pokud se zaměříme na houby opadu smrkových porostů, najdeme záznamy týkající se terestrických makromycetů, částečně sem mohou spadat studie půdní mykoflory (Kubátová *et al.* 1998, Nováková a Blažková 2000) a také taxonomické studie (Pilát 1968).

Co se týče makromycetů je pro horské smrčiny v porovnání s horskými smíšenými lesy typická spíše nižší druhová diverzita. Najdeme zde vzácné horské druhy a také druhy typické pro jehličnaté lesy severní Evropy. Dle pozorování sporokarpů roste ve smrkovém opadu často *Mycena galopus*, *Marasmius androsaceus*, *Micromphale perforans*, *Clitocybe vibecina*, *C. ditopa*, *Mycena vulgaris* a *Clavulina cristata* (Holec 2000). Společenstvu mikromycet smrkových půd pak dominují *Penicillium spinulosum*, *P. glabrum*, *Trichoderma viride*, *Beauveria brongniartii*, *Mortierella alpina*, *Mortierella elongata*, *Micromucor ramannianus* var. *ramannianus*, *Cladosporium herbarum* a *Verticillium psalliotae*. Tyto druhy byly získány z horních 5 cm půdy přímou inokulací půdy na agarové médium nebo zřed'ovací metodou (Kubátová *et al.* 1998). Izolací DNA z opadu smrku ztepilého byly nejčastěji získány sekvence bazidiomycetů jako je *Piloderma* sp., *Tylospora fibrillosa*, *Cortinarius biformis*, *C. gentilis* nebo *Hygrophorus olivaceoalbus*. Při zaměření na aktivní druhy ve společenstvu, izolací RNA, byla odhalena naopak převaha askomycetů (Baldrian *et al.* 2012).

¹² makromycety = houby, které mají velké (makroskopické) sporokarpy; vyšší houby; většinou se jedná o bazidiomycety, ale patří sem i některé askomycety (diskomycety, smrže, lanýže...), (Kirk *et al.* 2008)

2.5 Kultivační přístup k zjištění diverzity hub

Sledování plodnic hub, kultivace substrátu ve vlhkých komůrkách a kultivace substrátu na agarových médiích má v mykologii dlouholetou tradici. Během této doby byla vyvinuta různá selektivní a živná média, která nám usnadňují identifikaci některých skupin hub (Mueller *et al.* 2004). Podstatnou výhodou kultivačních metod je skutečnost, že je to jediná možnost jak získat kultury hub pro experimenty (Lindner *et al.* 2011) a budoucí studie. Tradiční kultivační metody ale čelí více nedostatkům než výhodám. Je to částečně kvůli nedostatečným znalostem o podmínkách růstu jednotlivých druhů a těžko také odhadovat potřeby neznámého společenstva hub. Proto tyto metody snadno vyloučí nekultivovatelné druhy, které mohou přitom být pro společenstvo významné. Odhaduje se, že méně jak 1% mikroorganismů lze pěstovat v kultuře (Torsvik a Øvreås 2002), což nás ještě neinformuje o jejich životaschopnosti a aktivitě ve vzorku. Naopak je tendence nadhodnocovat sporulující druhy a přehlížet sterilní a pomalu rostoucí mycelia. Další úskalí spočívají v komplikacích identifikace druhů dosud nepopsaných, nesporulujících a morfologicky neodlišitelných druhů jednoho morfotypu. Zpracování vzorků bývá časově náročné, pracné (Jeewon a Hyde 2007) a srovnatelných výsledků s metodami molekulárními lze dosáhnout až po provedení mnohonásobně více odběrů (O'Brien *et al.* 2005).

2.6 Molekulární přístup k zjištění diverzity hub

Molekulární metody jsou v mykologii široce využívány a zdokonalovány od konce 80. let minulého století, kdy bylo nejprve středem zájmu fylogenetické postavení hub v systému (Gouy a Li 1989). V posledních letech se výhody molekulárních metod začaly uplatňovat ve velké míře při zjišťování celkové diverzity houbového společenstva přímo ze substrátu (O'Brien *et al.* 2005, Buée *et al.* 2009, Jumpponen a Jones 2009, Öpik *et al.* 2009, Lindner *et al.* 2011, Baldrian *et al.* 2012). Tyto studie odhalují mnohem vyšší počty druhů než tomu je u prací s kultivačními přístupy, protože izolací DNA, získáme i DNA druhů pomalu rostoucích a nekultivovatelných na umělých médiích. K identifikaci hub se používá často oblast ITS ribozomální DNA, která je velmi variabilní a odlišuje houby na úrovni druhu. Avšak existují i skupiny hub, jejichž ITS rDNA nelze zachytit univerzálními

primery (Rosling *et al.* 2011). Na druhou stranu lze některé druhy nadhodnotit. Pokud se analyzuje pouze DNA, přidávají se k celkové diverzitě i druhy přítomné pouze např. jako spory, odpočívající částice či senescentní mycelium, které nejsou ve společenstvu aktivní (Purahong a Krüger 2012). Chyby v diverzitě mohou dále způsobovat chimérické sekvence, které vznikají při PCR a jsou kombinací DNA více druhů (Nilsson *et al.* 2010) nebo variabilních kopií ITS rDNA jednoho druhu (Wang a Wang 1997, Nilsson *et al.* 2008). Také míra abundance jednotlivých druhů zjištěná většinou množstvím amplifikovaného úseku ITS rDNA nemusí odpovídat skutečnosti, protože se počty kopií rDNA mezi druhy liší (Anderson a Cairney 2004, Dickie a FitzJohn 2007).

Podle zaměření výzkumu lze vybrat z molekulárních metod ty, které odhalí přímo sekvence jednotlivých taxonů nebo takové, které nám poskytnou jen fingerprint odlišitelných druhů, používané k porovnávání změn ve struktuře společenstva (Anderson a Cairney 2004).

Nejvhodnější metodou pro zjištění co nejpřesnější druhové diverzity environmentálních vzorků a abundance druhů je v dnešní době nejspíš 454 pyrosekvenace (jedna z metod sekvenování nové generace, Shendure a Ji 2008, Tedersoo *et al.* 2010, Lekberg *et al.* 2012). Díky 454 pyrosekvenaci lze získat z pouhých 4 g půdy okolo 1000 operačně taxonomických jednotek (OTU). Jedná se ale stále o finančně nákladnou metodu spojenou s náročným vyhodnocováním, která i přes identifikaci velkého množství druhů nedokáže splnit naši představu o odhalení všech druhů v přesném množství. Navíc se jako všechny ostatní metody potýká s množstvím neurčených dat v databázích nukleotidových a proteinových sekvencí, nedostatkem informací o vložených referenčních sekvencích a chybami v jejich identifikaci (Buée *et al.* 2009). Podobně přesné je také klonování, kterým lze získat ze 150 g půdy přes 400 OTU. Jeho výhodou je použití tradičního Sangerova sekvenování, čímž získáme velmi kvalitní sekvence izolovaných druhů a v porovnání s 454 pyrosekvenací jsou tyto sekvence delší a proto je lze snadněji identifikovat; nevýhodou je rozsáhlé laboratorní zpracování vzorků (Anderson a Cairney 2004, O'Brien *et al.* 2005, Shendure a Ji 2008, Nilsson *et al.* 2009, Tedersoo *et al.* 2010)

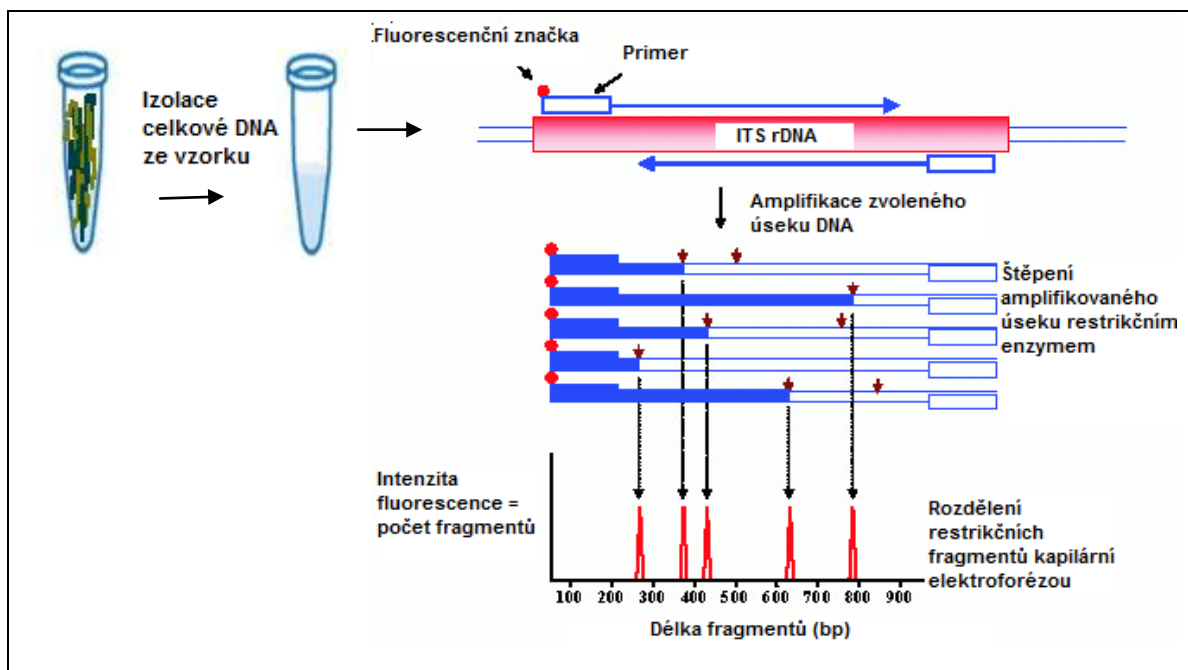
2.6.1 T-RFLP (terminal restriction length polymorphism)

Analýza polymorfismu terminálních restrikčních fragmentů T-RFLP (dříve také TRFPs) je fingerprintová metoda využívaná k zjišťování diverzity metagenomu, zejména pak diverzity bakteriální a houbové. Jedná se o relativně levnou metodu, kterou můžeme rychle odhalit změny společenstva v čase, prostoru nebo v odlišných podmínkách prostředí (Clement *et al.* 1997, Ursel *et al.* 2008, Gryndler *et al.* 2010).

Při T-RFLP je ze vzorku izolována DNA, poté se amplifikuje dostatečně variabilní úsek DNA s jedním nebo dvěma fluorescenčně značenými primery, amplifikát se rozštěpí vhodnou restrikční endonukleázou a vzniklé fragmenty se nechají rozdělit kapilární elektroforézou v sekvenátoru (Obr. 1). Pokud chceme ze vzorku amplifikovat ITS rDNA hub, používá se specifický houbový primer ITS1F a univerzální primer ITS4. Enzymů vhodných pro štěpení je více např. HhaI, Fnu4HI, HaeIII a Tsp5091, TaqI a NlaIII. Často se používají v kombinaci pro získání přesnějších výsledků (Gryndler *et al.* 2010).

Výsledkem analýzy je restrikční profil vzorku, který udává délku a fluorescenční intenzitu jednotlivých koncových fragmentů. Tyto fragmenty můžeme v ideálním případě považovat za samostatné druhy, které se liší pořadím nukleotidů v sekvenci a tím i štěpným místem pro daný enzym. Intenzita fluorescence udává relativní četnost druhu ve vzorku (Gryndler *et al.* 2010). Bohužel restrikční místo se může u některých druhů shodovat, čímž dochází k podhodnocení diverzity (Clement *et al.* 1997). Naopak diverzitu mohou nadhodnocovat pseudoterminální fragmenty vzniklé nejspíš ze sekundární struktury jednořetězcové DNA (Egert a Friedrich 2003), nebo fragmenty vzniklé špatnou specifitou enzymu nebo částečně dosyntetizované fragmenty zbytkovou polymerázou (Hartmann *et al.* 2007). Tyto problémy se dají částečně minimalizovat pečlivou laboratorní prací, popřípadě vyloučením slabých signálů z analýzy (Gryndler *et al.* 2010).

Při vyhodnocení diverzity se pak pracuje s neidentifikovanými fragmenty, nebo se k jejich identifikaci používá klonování, či virtuální knihovna štěpných míst. Pokud jsou k dispozici čisté kultury druhů, které ve vzorku předpokládáme, je možné vyzkoušet jejich reálné štěpení. To je praktické jelikož se fragmenty nemusí při elektroforéze dělit zcela přesně, chybovost bývá o 1 až 2 báze (Bukovská *et al.* 2010, Gryndler *et al.* 2010), a houba může mít také heterogenní kopie DNA a tvořit více štěpů (Egert a Friedrich 2003). Zahrnutím hub izolovaných ze zkoumané lokality do analýzy tak předcházíme špatné interpretaci T-RFLP profilů (Avis *et al.* 2006).



Obr. 1: Schéma analýzy T-RFLP (upraveno dle www.nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method).

2.7 Seznam použitých zkratk

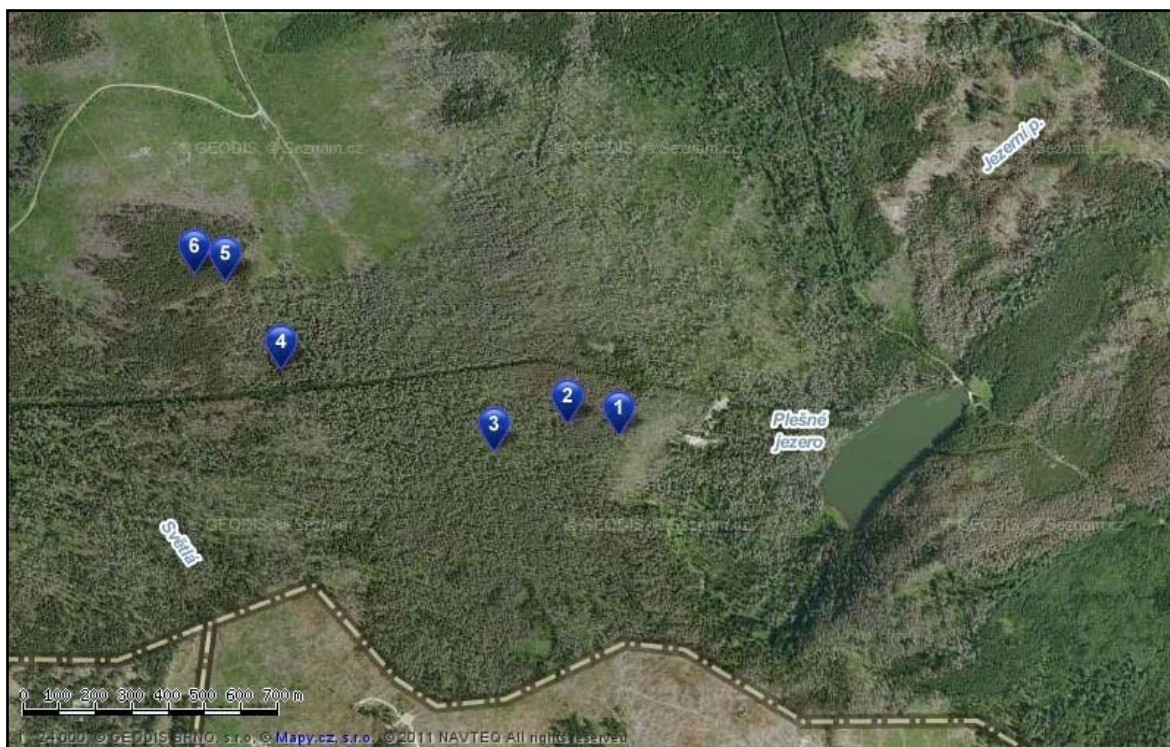
- cf. latinsky *confer*, nejednoznačné určení taxonu
- f. latinsky *forma*, forma druhu
- insertae sedis taxon s nejasným postavením ve fylogenetickém systému
- ITS anglicky *internal transcribed spacer*, mezerník sekvence malé a velké ribozomální podjednotky
- LSU anglicky *large subunit*, sekvence velké ribozomální podjednotky
- sp. latinsky *species*, označení druhu z určeného rodu či vyšší taxonomické jednotky
- T-RFLP anglicky *terminal restriction length polymorphism*, metoda analýzy polymorfismu terminálních restričních fragmentů
- var. latinsky *varietas*, varieta druhu

3 Materiál a metody

3.1 Studovaná lokalita a odběr vzorků

Lokalita pro odběr jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*) byla vybrána v 1. zóně Národního Parku Šumava v oblasti Trojmezna (1300 m n. m.) v rámci projektu č. 526/08/0751 Grantové agentury České republiky. Oblast je pokrytá původní horskou smrčinou s malou příměsí jasanu ztepilého (*Fraxinus excelsior*), podrost tvoří metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*), třtina chloupkatá (*Callamagrostis villosa*), brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) a papratka horská (*Athyrium distentifolium*). Převažujícím typem půdy jsou podzoly, roční průměrná teplota se pohybuje od 3,5 do 4°C a průměrné srážkové úhrny činí ročně 1033 mm (Kopáček *et al.* 2002).

Zde byly vybrány tři plochy ve smrkovém lese regenerujícím po poškození kůrovcem (úhyn porostu v letech 2000-2002) a tři kontrolní plochy bez poškození (Obr. 2 a Tab. 1). Souřadnice a nadmořská výška vytyčených ploch byla změřena pomocí GPS (Garmin Colorado 300). V prvních měsících experimentu byla kůrovcem zasažena i kontrolní lokalita. Ve stejné nadmořské výšce už nebylo možné najít vhodný nepoškozený les a kontrolní lokalita se tedy liší různou délkou poškození (pracovní název pro tyto lokality zůstal **kůrovec a kontrola**).



Obr. 2: Letecký snímek (cca rok 2008) smrkového porostu v oblasti Trojmezí, NP Šumava. Body 1-3 označují plochy poškozené kůrovcem, body 4-6 plochy kontrolní. (www.mapy.cz)

Tab. 1: Souřadnice GPS a nadmořská výška sledovaných ploch.

plocha	souřadnice GPS	nadmořská výška	
plocha 1	N 48° 46' 35.4", E 13° 51' 18.1"	1303 m	plochy poškozené kůrovcem
plocha 2	N 48° 46' 36.3", E 13° 51' 11.2"	1314 m	
plocha 3	N 48° 46' 33.8", E 13° 51' 01.5"	1305 m	
plocha 4	N 48° 46' 40.7", E 13° 50' 33.0"	1296 m	plochy kontrolní
plocha 5	N 48° 46' 48.4", E 13° 50' 25.3"	1268 m	
plocha 6	N 48° 46' 49.1", E 13° 50' 21.3"	1276 m	

Na počátku experimentu (15. září 2008) byly v blízkosti experimentálních lokalit nasbírány čerstvě spadlé smrkové jehlice ze stromů poškozených kůrovcem. V laboratoři byl materiál usušen při pokojové teplotě do konstantní hmotnosti a následně byly 10 g jehlic plněny opadové sáčky ze syntetické záclonoviny (rozměry 10 × 20 cm, velikost ok 1 mm). Pro zjištění iniciální diverzity byl proveden odběr 10 jehlic z 10 sáčků (čas T₀).

Sáčky byly umístěny na jednotlivých plochách v řadě na povrch lesní půdy (Obr. 3) 29. září 2008.

Následné odběry (Tab. 2) probíhaly od října 2008 do října 2011, dvakrát ročně na jaře (květen) a na podzim (říjen). Odběr z května 2011 byl vynechán, protože během času bylo těžší sáčky zarostlé v podrostu nalézt a bylo lepší nechat zbytek sáčků na delší interval. Z každé plochy bylo vždy odebráno 10 sáčků, tj. celkově během 6 odběrů 360 sáčků z celé lokality plus 10 iniciálních.

Tab. 2: Přehled odběrů opadových sáčků na lokalitě.

datum odběru	označení	měsíc
29. 09. 2008	čas T0	0
20. 10. 2008	čas T1	1
26. 05. 2009	čas T2	8
12. 10. 2009	čas T3	13
24. 05. 2010	čas T4	20
11. 10. 2010	čas T5	25
17. 10. 2011	čas T6	37



Obr. 3: Opadové sáčky se smrkovým jehličím umístěné v řadách.

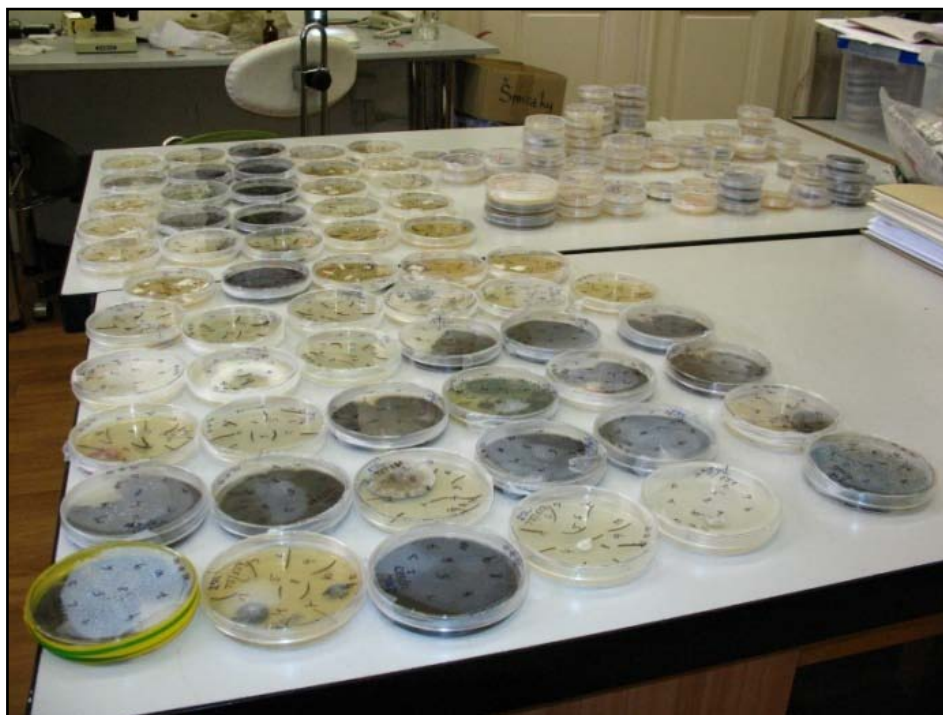
3.2 Kultivace jehlic, izolace kmenů a uchovávání kultur

Bezprostředně po odběru byly sáčky převezeny do laboratoře a dále uchovávány při 4 °C. Jehličí ze sáčků sloužilo pro více analýz (izolace DNA, RNA; izolace hub; analýza enzymů, ergosterolu, PLFA a další chemické a fyzikální analýzy) prováděných různými pracovišti.

Pro izolaci hub jsem sterilně vybrala z každého sáčku 10 jehlic, které jsem povrchově sterilizovala 30% peroxidem vodíku po dobu 90 s na horizontální třepače. Dobu sterilizace jsem neměnila ani v pozdějších fázích sukcese jehlic, kdy už zřejmě peroxid vodíku pronikal hlouběji dovnitř jehlice a mohl redukovat množství endofytů. Jehlice jsem přenesla na 9cm Petriho misku s 2° sladinovým agarem (tj. 2°SL, konečný obsah sacharózy 2 % měřeno Ballingovým cukroměrem, agar 18 g/l; Fassatiová 1986). Kultivace misek probíhala v laboratorní teplotě (22-24 °C), v přirozeném světle, po dobu potřebnou k nárůstu i pomaleji rostoucích druhů většinou 6 až 12 týdnů (Obr. 4).

Vyrůstající kolonie jsem na základě fenotypických znaků (rychlost růstu, morfologie, barva, mikroskopické znaky, apod.) roztřídila do unikátních morfotypů (neboli operačně taxonomická jednotka OTU). Pro každý morfotyp jsem izolovala jeden kmen do čisté kultury (označení ZK190-381)¹³.

¹³ Kmeny ZK1-16 pocházely z předběžného testování metodiky na jehlicích z NPCŠ, kmeny ZK17-189 pocházely z jehlic z padlých kmenů (Koukol *et al.* 2012), z živých jehlic, z živých jehlic v opadu a z opadových sáčků odebraných při testování metodiky v NP Šumava. Kmeny ZK323-324, ZK 328-334, a ZK 345 byly získány z živých jehlic odolného jedince smrku ztepilého.



Obr. 4: Kultivace smrkových jehlic na Petriho miskách.

V jednotlivých miskách jsem zaznamenávala absolutní četnost morfotypů v jednotlivých miskách jako počet jehlic, ze kterých vyrostly, a následně jsem spočítala jejich relativní četnost pro plochu dle vzorce:

$$f_i = \frac{n_i}{n}$$

f_i označuje relativní četnost druhu i na ploše

n_i označuje počet kolonizovaných jehlic druhem i na ploše

n je celkový počet jehlic na ploše = 100

Celkové četnosti všech morfotypů jsou v součtu vyšší než 100%, protože na jehlici mohlo současně růst několik kolonií různých morfotypů. Pokud jeden morfotyp tvořil na jehlici více kolonií, přičítla jsem mu jen jednu, protože houba jednoho genotypu může jehlicí prorůst a vytvářet více kolonií. Četnosti morfotypů, které se později ukázaly na základě morfologických a molekulárních znaků jako shodné, jsem ve výsledku sloučila. Zaznamenávala jsem i počet sterilních jehlic.

3.3 Izolace DNA, PCR a sekvenování

Ze všech kmenů byla izolována DNA. DNA z části kmenů jsem izolovala na Katedře Botaniky PřF UK a část byla izolována v Mikrobiologickém ústavu AVČR. U kultur starých 7-14 dní jsem provedla izolaci DNA komerční sadou Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.) podle pokynů v návodu. Koncentraci čisté DNA jsem měřila na spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Dále jsem z ribozomální DNA amplifikovala oblast ITS1 - 5,8S - ITS2 a doplňkově oblast D1-D2 LSU s použitím kombinace primerů ITS1/ITS4, ITS1/NL4, ITS1F/ITS4, ITS1F/NL4, NL1/ITS4, NL1/NL4 (Tab. 3) dle výsledků amplifikace nebo dle potřeby identifikace druhu (White *et al.* 1990, Gardes a Bruns 1993, O'Donnell *et al.* 1993)

Tab. 3: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci ITS1 - 5,8S - ITS2 a 28S rDNA.

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	forward primery
ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')	
NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')	
ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	revers primery
NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')	

Pro amplifikování DNA jsem nejdříve používala směs s přidáním jednotlivých složek a polymerázou Gold (Applied Biosystems, Tab. 4), později jsem začala používat již hotovou směs MasterMix (5prime, Tab. 5). Amplifikace byla provedena v termocykleru XP cycler (Bioer) s následujícím cyklem: počáteční teplota 95°C/10 min, 35 cyklů (denaturace 94°C/1 min, annealing 53°C/1 min, elongace 72°C/1 min), závěrečná teplota 72°C/10 min. PCR produkty jsem přečistila kitem GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma). Sekvenaci provedla firma Macrogen (Soul, Korea) a laboratoř sekvenace DNA PřF UK v Praze. Získané sekvence jsem poté upravila v editoru Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems), pro alignování sekvencí mezi sebou jsem použila editor Bioedit (Hall 1999)

Tab. 4: Složení směsi pro PCR houbové DNA (objem 20 µl)

deionizovaná H ₂ O	9,9 µl
Enhancer (5prime)	4 µl
dNTP's 10 mM	0,4 µl
pufr Gold 10x	2 µl
Gold polymeráza 1U/µl (Applied Biosystems)	0,2 µl
forward primer 10 pmol/µl	0,25 µl
revers primer 10 pmol/µl	0,25 µl
MgCl ₂ 25mM	2 µl
DNA	1 µl

Tab. 5: Složení směsi pro PCR houbové DNA s použitím MasterMix (objem 20 µl)

deionizovaná H ₂ O	10 µl
MasterMix (5prime)	8 µl
forward primer 10 pmol/µl	0,5 µl
revers primer 10 pmol/µl	0,5 µl
DNA	1 µl

3.4 Identifikace kmenů

Pro druhovou identifikaci morfortypů jsem používala kombinaci fenotypových znaků a porovnání jejich DNA sekvence s databází GenBank¹⁴. Nesporulujících kmeny jsem kultivovala na dalších médiích jako je bramborovo-mrkvový agar, bramborovo-dextrózový agar (PCA, PDA; Bills a Foster 2004) nebo agar chudý na živiny (SNA; Leslie a Summerell 2006) pro lepší podnícení sporulace a vystavovala je UVB záření. Kmeny jsem uchovávala při 4 °C na šikmých kulturách s 2°SL.

¹⁴ pomocí algoritmu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Morfologické znaky jsem sledovala v Melzerově činidle a dokumentovala jsem je digitálním fotoaparátem (Olympus E-510, později Olympus DP72) připojeným k mikroskopu Olympus BX 51. Pro měření velikostí houbových struktur jsem využila software Quick Photo Micro 2.3 (Promicra). K určování na základě fenotypu jsem používala základní mykologické určovací klíče a webové stránky (Ellis 1971, Ellis 1976, Domsch *et al.* 1980, Sutton 1980, Nag Raj 1993, Leslie a Summerell 2006, www.isth.info) nebo konkrétní monografie zabývající se danými druhy.

Pro určení kmenů na základě sekvence DNA jsem vyhledávala v databázi GenBank (pro rod *Trichoderma* také TrichoBLAST, www.isth.info) nejbližší podobné referenční sekvence. Odlišnosti sekvencí do 2-3 % jsou v některých studiích přiřazovány vnitrodruhové variabilitě (Nilsson *et al.* 2009). Sekvence s podobností 97 (98)-100 % jsou pak považovány za stejný druh, sekvence s podobností 94-97 % za stejný rod (Bakys *et al.* 2009, Persson *et al.* 2009). Vzhledem k nestejně míře vnitrodruhové variability ITS mezi druhy hub (Nilsson *et al.* 2008) je však většinou třeba posuzovat správnou identifikaci individuálně. Pokud se sekvence shodovala s referenční sekvencí v 98-100%, tak jsem ji přiřadila název taxonu uvedený u referenční sekvence. Pokud byla shoda nižší, nebo sekvence měla pouze identifikační popis, tak jsem konečné pojmenování zvažila s ohledem na postavení sekvence ve fylogenetickém systému hub a s ohledem na fenotyp kmenu.

3.5 Konstrukce fylogenetických stromů

Při tvorbě fylogenetických stromů jsem sekvence ITS upravila v programu Bioedit (Hall 1999) spolu s několika příbuznými sekvencemi ITS z GenBanku. Alignment zvlášť pro bazidiomycety a askomycety jsem nechala vytvořit programem Muscle (www.ebi.ac.uk). Vlastní stromy jsem pak zhotovila v programu MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) metodou Neighbor-joining (parametry Maximum Composite Likelihood a complete deletion) Bootstrapové podpory větví byly spočítány na základě 10 tisíc opakování analýzy. Jako outgroup pro bazidiomycety jsem vybrala sněť *Ustilago maydis* a pro askomycety kvasinku *Pichia membranifaciens*. Některé sekvence ve stromech chybí, protože jsem ITS sekvence z kmenů nezískala, nebo nebyly potřebné kvality.

3.6 T-RFLP

Pro tuto metodu bylo z 5 sáčků na plochu odebráno 0,3 g jehličí pro izolaci DNA. DNA jsem izolovala dle protokolu Sagové-Marečkové (2008) a následně jsem ji přečistila komerčním kitem GeneClean Turbo (MP Biomedicals). Koncentraci DNA jsem změřila na spektrofotometru Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) a přítomnost DNA jsem ještě ověřila PCR (Tab. 6) v termocykleru GenePro (Bioer) s cyklem: počáteční teplota 94°C/5 min, 35 cyklů (denaturace 94°C/1 min, annealing 55°C/1 min, elongace 72°C/1 min), finální teplota 72°C/10 min. Zviditelnění amplifikovaných vzorků jsem provedla elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu v 1×TAE pufu.

Tab. 6: Složení směsi pro PCR celkové DNA z jehličí (objem 25 µl)

deionizovaná H ₂ O	16,75 µl
BSA 10 mg/ml	1,5 µl
dNTP's 10 mM	0,5 µl
pufu pro polymerázu 10×	2 µl
DyNAzyme II DNA polymeráza (ThermoScientific) 2U/µl	0,2 µl
primer ITS1F 10 pmol/µl	1 µl
primer ITS4 10 pmol/µl	1 µl
DNA	1 µl

Dále jsem z DNA amplifikovala oblast ITS1 – 5,8S – ITS2 a to s fluorescenčně značenými primery 5'HEX¹⁵-ITS1F a 5'6-FAM¹⁶-ITS4 (Tab. 7). Reakce PCR proběhla v termocykleru GenePro (Bioer) s následujícím cyklem: počáteční teplota 95°C/4 min, 34 cyklů (denaturace 95°C/1 min, annealing 52°C/1 min, elongace 72°C/2 min), závěrečná teplota 72°C/10 min. Amplifikovaný úsek jsem nechala 30 min při 37°C naštěpit restrikcí enzymem NlaIII, který štěpí v místě CATG (štěpicí směs: 16,5 µl deionizované vody, 2,5 µl (10×) NEBuffer 4 pro NlaIII, 0,5 µl (100×) BSA, 0,5 µl enzymu

¹⁵hexachlorofluorescein (zelený signál)

¹⁶6 – karboxyfluorescein (modrý signál)

NlaIII, 5µl PCR produktu). Po naštěpení jsem enzym ve vzorcích inaktivovala zvýšením inkubační teploty na 80°C po dobu 20 min. Výsledný produkt jsem přečistila kitem Sigma Spin Post-Reaction, přičemž jsem konečné vymytí DNA provedla deionizovanou vodou a ne pufrem, který je součástí kitu (certifikovaná metodika Gryndler *et al.* 2010). Konečnou analýzu vzorků provedla laboratoř kapilární elektroforézy MBÚ AVČR. Výsledky jsem vyhodnotila v programu GeneMarker (Softgenetics). Program vyhodnocoval fragmenty o délce 60-600 bazí a intenzitě signálu 50-30000 tj. počet fragmentů. Délky fragmentů menší než 60 bazí totiž kapilární elektroforéza nedělí dostatečně spolehlivě a slabé signály mohou zahrnovat šum nebo chybové fragmenty. Výstupem byla tabulka pro obě fluorescenční barvy s délkou a intenzitou fragmentů každého vzorku.

Tab. 7: Složení směsi pro PCR celkové DNA z jehličí s fluorescenčně značenými primery (objem 25 µl)

deionizovaná H ₂ O	10,5 µl
PPP-mix (Top-Bio)	12,5 µl
primer HEX-ITS1F 10 µM	0,5 µl
primer 6-FAM-ITS4 10 µM	0,5 µl
DNA	1 µl

Pro další zpracování výsledků jsem použila pouze data pro zelenou fluorescenční barvu, jelikož DNA tvořila více fragmentů od primeru ITS1F. Fragmenty delší než 450 bazí jsem vyřadila, kvůli zhoršující se schopnosti kalibrace s délkou fragmentu. Dále jsem intenzitu signálu vyjádřila jako promile z celkového součtu signálů, vyřadila jsem fragmenty s četností menší než 5 ‰ a data jsem znovu normalizovala.

Pro identifikaci některých fragmentů z restrikčního profilu vzorku jsem provedla amplifikaci oblasti ITS s fluorescenčně značenými primery a naštěpení DNA i u několika druhů z kultivace na agaru. Pro zjištění teoretického místa štěpu, jsem sekvence ITS vybraných kmenů doplnila o chybějící části srovnáním s delší podobnou sekvencí z GenBanku a virtuálně jsem ji naštěpila v místě CATG v programu Restriction Mapper (www.restrictionmapper.org).

3.7 Statistické vyhodnocení a analýza diverzity

Statistické analýzy, mnohorozměrné analýzy, výpočet Shanonnova indexu a grafická zobrazení struktury dat jsem prováděla v programech PAST (Hammer *et al.* 2001) a R program (R Development Core Team 2011).

3.7.1 Shannonův index

Shannonův index diverzity jsem nechala spočítat v programu PAST, přičemž do výpočtu jsem použila celkovou četnost jednotlivých druhů na lokalitě vztaženou na celkový počet kolonií na lokalitě a u dat pro T-RFLP relativní četnost fragmentů. Shannonův index jsem nechala vypočítat i pro jednotlivé plochy na lokalitách. Pro ověření odlišnosti indexů diverzity v čase a mezi lokalitami jsem použila two way ANOVA (analysis of variance). Předpokladem toho testu je normální rozdělení a podobný rozptyl (test Shapiro-Wilk a Levenův test).

3.7.2 Mnohorozměrné analýzy

Strukturu dat pro kůrovcové a kontrolní lokality v jednotlivých odběrech a v průběhu celého pokusu jsem zobrazovala nepřímou mnohorozměrnou analýzou PCA (*principal component analysis*) a neparametrickou analýzou NMDS (*non-metric multidimensional scaling*, distanční kritérium Bray-Curtisův index). Stejně jsem postupovala i u dat pro 3 plochy na lokalitě. V analýzách jsem používala datovou matici četností jednotlivých druhů (fragmentů) a matici presence/absence jednotlivých druhů (fragmentů). Druhy (fragmenty), které se vyskytovaly pouze v jednom vzorku, jsem z analýz vyloučila. Tyto analýzy mně pomohly určit přibližnou podobnost či rozdíly mezi daty. Výsledky zobrazuji pouze analýzou PCA na datech presence/absence pro kůrovcové a kontrolní lokality a pro sloučená data presence/absence z obou lokalit.

Porovnání podobnosti v druhovém složení a abundanci jednotlivých druhů kůrovcových a kontrolních lokalit jsem provedla metodou one way ANOSIM (*analysis of similarities*) s distančním kritériem Bray-Curtis, 9999 permutacemi a Bonferroniho korekcí p-hodnot. Jedná se o neparametrickou metodu analogickou k parametrické metodě ANOVA, kterou jsem použila kvůli nenormálnímu rozložení dat o druzích (test Shapiro-Wilk). ANOSIM udává hodnotu R, která může nabývat hodnot od -1 do 1, přičemž záporné hodnoty by indikovaly rozdílnost uvnitř vzorku a pokud se vyskytnout je nutné

přehodnotit metodický přístup sběru vzorků. Hodnoty nad 0,75 ukazují na jasnou odlišitelnost skupin, hodnoty pod 0,5 již značí určitý překryv skupin, a pokud je R hodnota menší než 0,25, pak jsou skupiny neodlišitelné (Chapman a Underwood 1999, Peršoh *et al.* 2012)

Ve statistickém programu R jsem dále zjišťovala permutační metodou MANOVA (*multivariate analysis of variance*) podíl vysvětlené variability v datech pro environmentální proměnné **čas**, **přítomnost kůrovce** a **plocha**. Pro analýzu jsem použila data o presenci/absenci druhů druhů i data o abundanci. Data o abundanci z kultivace nebylo třeba transformovat, data o abundanci z T-RFLP jsem transformovala odmocninou. Jelikož v matici dat z kultivace byly i vzorky bez jediného druhu, přidala jsem do každého vzorku fíngovaný druh, aby mohla analýza proběhnout. Výpočet používal Bray-Curtisův distanční index při 999 permutacích.

4 Výsledky

4.1 Diverzita hub smrkového opadu v ekosystému po kůrovcové kalamitě – metodou kultivace

K popisu diverzity hub na smrkových jehlicích jsem v této kapitole použila jak lokalitu kůrovcovou, tak lokalitu původně nenapadenou kontrolní, kterou můžeme považovat za ekosystém v primární fázi poškození kůrovcem. Průběžně budu výsledky z obou lokalit srovnávat.

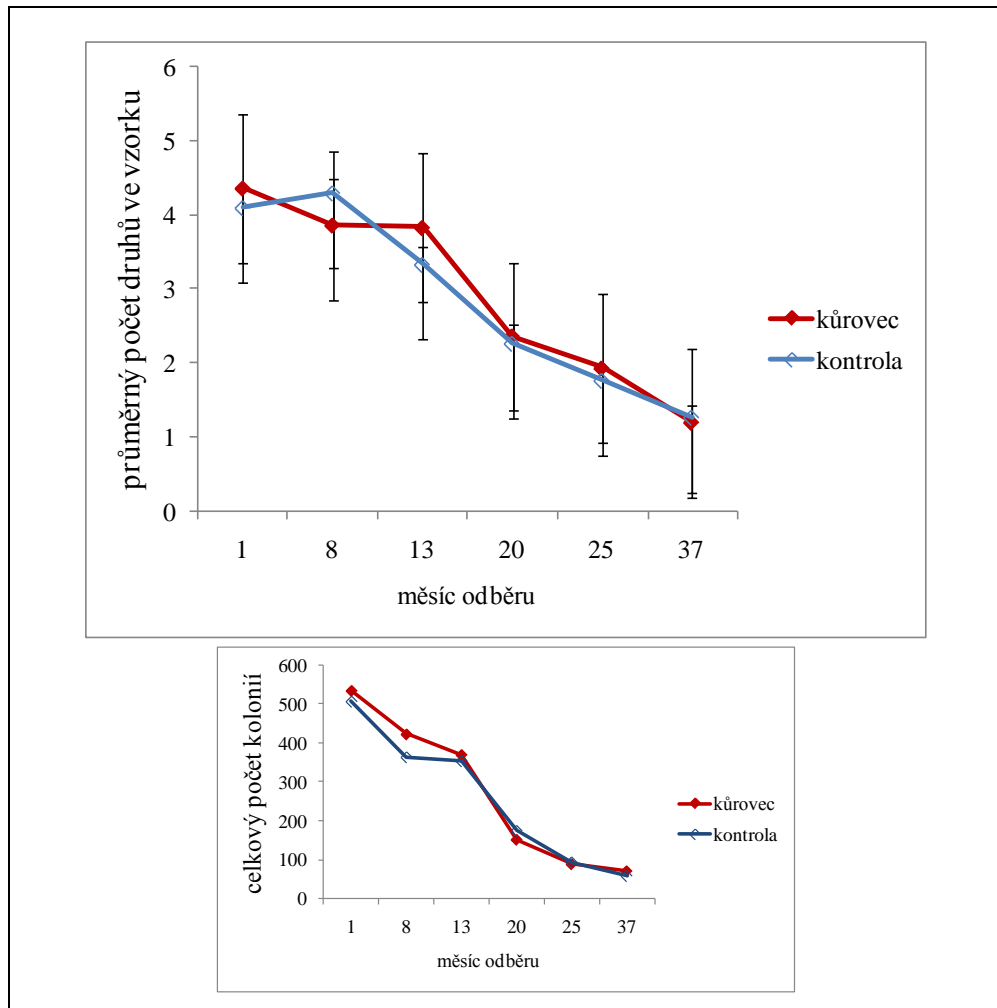
Během 7 odběrů tříletého pokusu jsem ze smrkových jehlic z opadových sáčků izolovala 71 druhů hub (Tab. 8) patřících do 18 řádů a 5 tříd. Z toho patřily 4 taxony mezi zygomycety, 10 taxonů mezi bazidiomycety a 57 taxonů mezi askomycety. Postavení získaných izolátů bazidiomycetů a askomycetů v taxonomickém systému jsem znázornila fylogenetickými stromy (Příloha 2, Příloha 3, problematické sekvence nebyly zařazeny).

Tab. 8: Taxonomické zařazení hub izolovaných ze smrkového opadu během 37 měsíců sukcese (taxonomické zařazení podle www.indexfungorum.org a www.mycobank.org)

izolované taxony	řád	třída	oddělení	
<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	Mucorales	Incertae sedis	Zygomycota	
<i>Mucor zonatus</i>				
<i>Umbelopsis ramanniana</i>				
<i>Mortierella</i> sp.	Mortierellales	Incertae sedis		
<i>Marasmius androsaceus</i>	Agaricales	Agaricomycetes	Basidiomycota	
<i>Micromphale perforans</i>				
<i>Mycena galopus</i>				
<i>Mycena metata</i>				
<i>Mycena</i> sp.				
Cantharellales sp.				Cantharellales
<i>Minimedusa</i> sp.				
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Polyporales			
<i>Trametes versicolor</i>				
<i>Entomocorticium</i> sp.	Russulales			
<i>Botrytis cinerea</i>	Helotiales	Leotiomycetes	Ascomycota	
<i>Ceuthospora pinastri</i>				
<i>Cistella acuum</i>				
<i>Cistella</i> sp.				
Helotiales sp. 1				
Helotiales sp. 2				
Helotiales sp. 3				
<i>Chalara</i> cf. <i>affinis</i>				
<i>Chalara holubovae</i>				
<i>Chalara hyalocuspica</i>				
<i>Chalara longipes</i>				
<i>Chalara piceae-abietis</i>				
<i>Infundichalara microchona</i>				
<i>Lachnum</i> sp.				
<i>Phacidiopycnis</i> sp. 1				
<i>Phacidiopycnis</i> sp. 2				
<i>Phialocephala fortinii</i>				
<i>Phialocephala</i> sp.				
<i>Varicosporium elodeae</i>				
<i>Varicosporium</i> sp.				
<i>Lophodermium piceae</i>				Rhytismatales
Rhytismataceae sp.				
Leotiomycetes sp.				Insertae sedis
<i>Penicillium spinulosum</i>	Eurotiales	Eurotiomycetes		
<i>Penicillium canescens</i>				
<i>Thysanophora penicillioides</i>				

Tab. 8: Pokračování

izolované taxony	řád	třída	oddělení
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	Chaetothyriales	Eurotiomycetes	Ascomycota
<i>Rhinocladiella</i> sp.			
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	Capnodiales	Dothideomycetes	
<i>Cladosporium herbarum</i>			
<i>Hormonema dematioides</i>	Dothideales		
<i>Scleroconidioma sphagnicola</i>			
<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporales		
<i>Fusicladium</i> sp.			
<i>Herpotrichia juniperi</i>			
<i>Herpotrichia</i> sp.			
<i>Dothideomycetes</i> sp.	Insertae sedis		
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	Hypocreales		
<i>Fusarium avenaceum</i>			
<i>Fusarium flocciferum</i>			
<i>Fusarium</i> sp.			
<i>Hypocreales</i> sp.			
<i>Trichoderma atroviride</i>			
<i>Trichoderma koningii</i>			
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>			
<i>Trichoderma parasilulifera</i>			
<i>Trichoderma pleuroticola</i>			
<i>Trichoderma polysporum</i>			
<i>Trichoderma</i> sp.			
<i>Trichoderma viride</i>			
<i>Cytospora</i> sp. 1		Diaporthales	
<i>Chaetomium funicola</i>	Sordariales		
<i>Lecythophora hoffmannii</i>	Coniochaetales		
<i>Geniculosporium</i> sp.	Xylariales		
<i>Clasterosporium</i> sp.	Insertae sedis		
<i>Sordariomycetes</i> sp.	Insertae sedis		
<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	Insertae sedis		



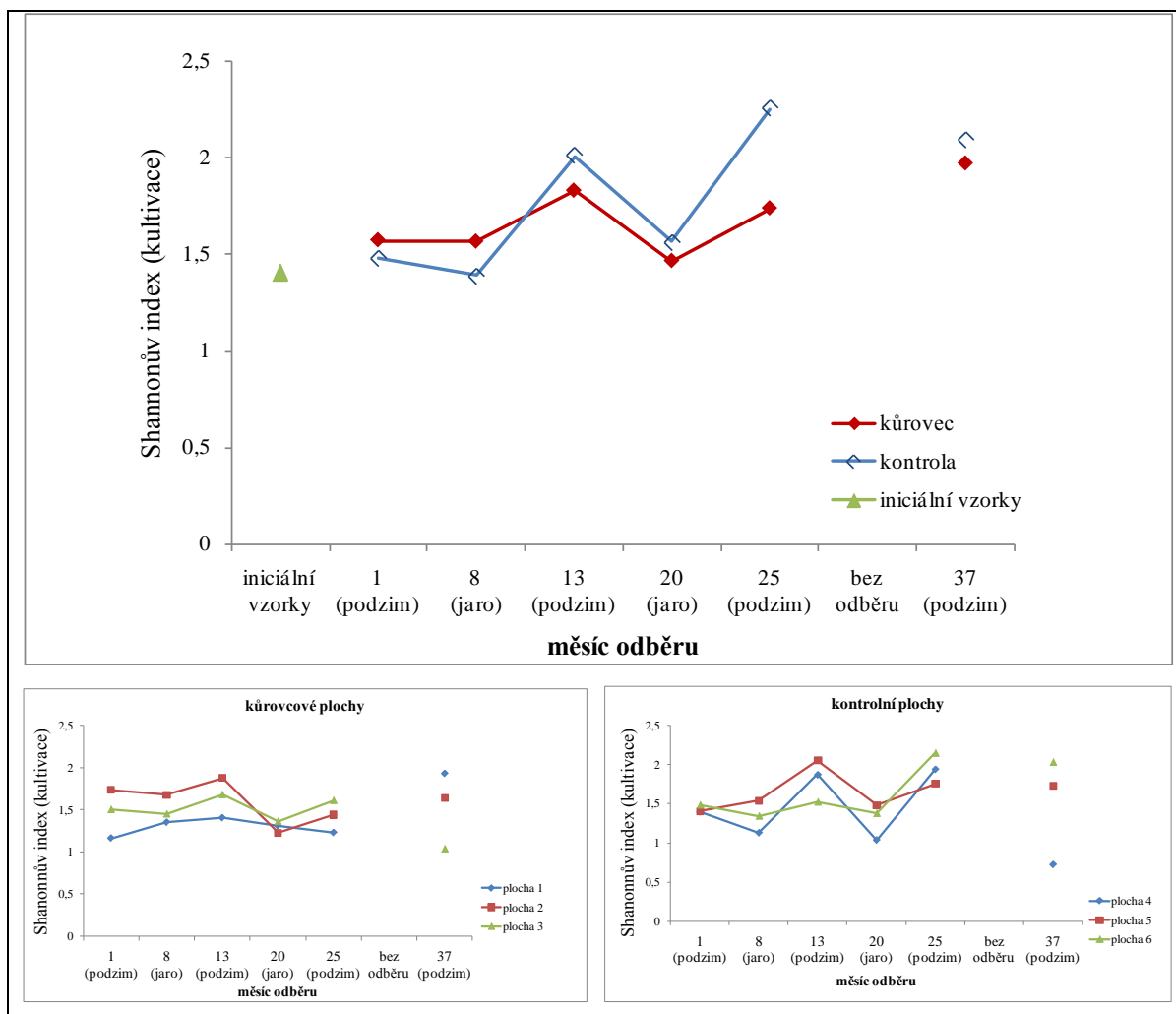
Obr. 5: Změna počtu druhů ve vzorku tj. v 10-ti jehlicích (průměr ± S.D.) z opadového sáčku v průběhu 37 měsíců na kůrovcových a kontrolních lokalitách (nahore). Změna celkového počtu kolonií na těchto lokalitách v průběhu 37 měsíců (dole).

Počet taxonů ve vzorku se pohyboval od 0-8, průměrné hodnoty během sukcese klesaly od 4 do 1 taxonu. V počtech druhů ve vzorku, ani počtem kolonií hub na lokalitě se kůrovcové a kontrolní lokality skoro nelišily (Obr. 5). Celkově bylo na lokalitě v jednom odběru 11 až 22 druhů (Příloha 4). Obě lokality spolu sdílely 33 druhů, 23 druhů bylo jedinečných pro kontrolní lokality a 14 pro kůrovcové (Tab. 9). *Cytospora* sp. 1 byla nalezena pouze v iniciálních vzorcích.

Tab. 9: Seznam druhů nalezených pouze na jedné lokalitě.

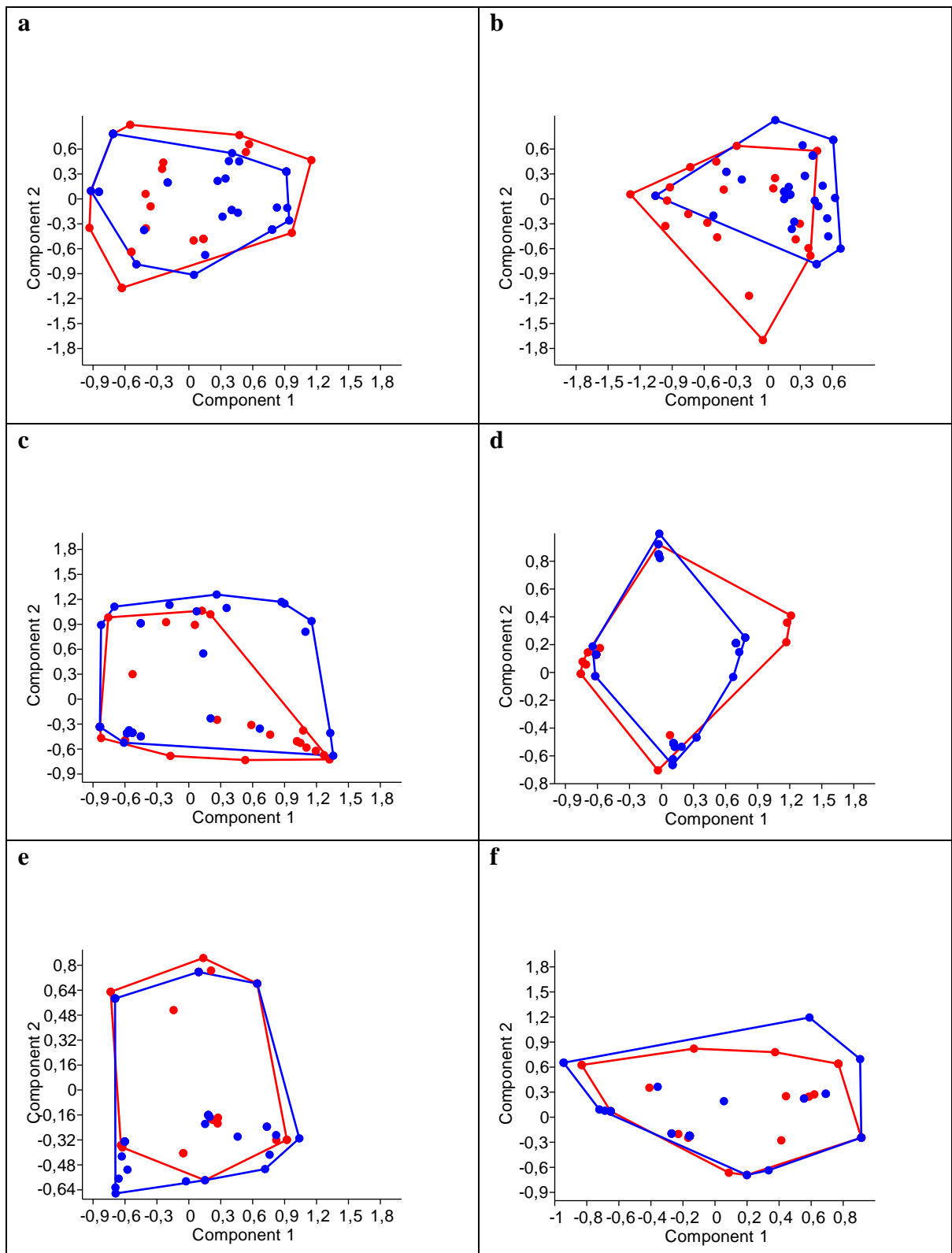
Druhy jedinečné pro kontrolní lokality	Druhy jedinečné pro kůrovcové lokality
<i>Botrytis cinerea</i> Cantharellales sp. Cistella sp. Cladosporium cladosporoides Dothideomycetes sp. Entomocorticium sp. Fusarium sp. Helotiales sp. 2 Helotiales sp. 3 Infundichalara microchona Ischnoderma benzoinum Lachnum sp. Leotiomyces sp. Micromphale perforans Minimedusa sp. Mortierella sp. Phialocephala fortinii Rhytismataceae sp. Sordariomyces sp. Trametes versicolor Trichoderma atroviride Trichoderma sp. Varicosporium sp.	<i>Cylindrocarpon magnusianum</i> Clasterosporium sp. Fusarium avenaceum Fusarium flocciferum Geniculosporium sp. Chaetomium funicola Chalara holubovae Mucor zonatus Mycena metata Penicillium spinulosum Phacidiopycnis sp. 2 Phialocephala sp. Umbelopsis ramanniana Verticillium fungicola var. fungicola

Shannonovy indexy pro kůrovcové a kontrolní lokality (Obr. 6) vykazovaly podobný trend v čase, kdy se diverzita na jaře snižovala. Kůrovcové lokality měly první dva odběry diverzitu vyšší než kontrolní, po zbytek času naopak nižší. U jednotlivých ploch je pak vidět značná různorodost. Hlavně v posledním odběru u některých ploch diverzita stoupala a u některých strmě klesala. Analýza variance neprokázala signifikantní rozdíly v čase ani mezi lokalitami.



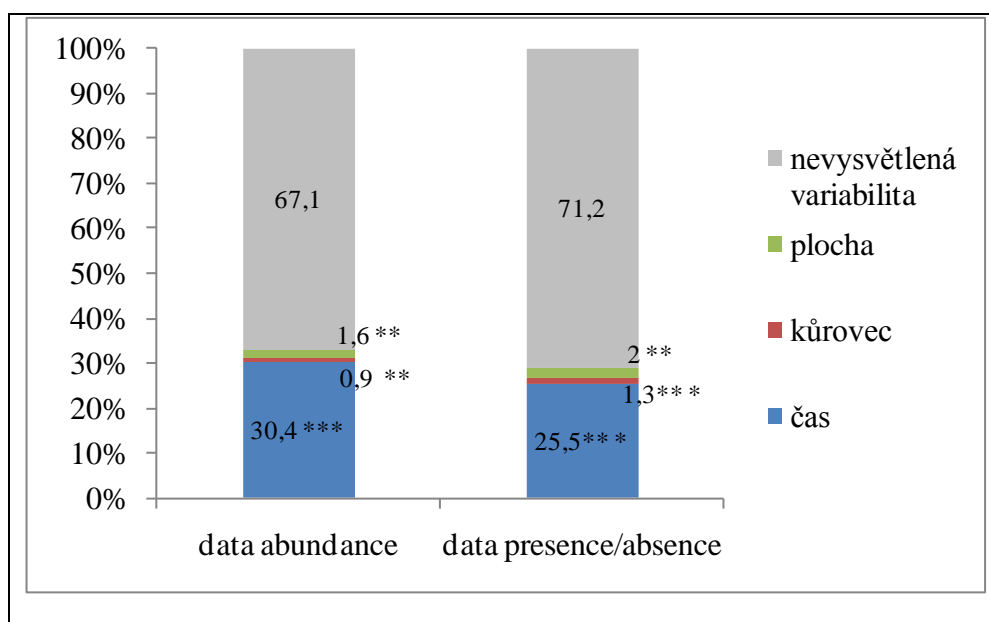
Obr. 6: Shannonův index diverzity pro lokality v průběhu 37 měsíců (nahore). Shannonův index diverzity pro jednotlivé plochy v průběhu 37 měsíců (dole).

Data pro presenci/absenci druhů z kůrovcových a kontrolních lokalit vykazovaly v analýze PCA podobnou strukturu (Obr. 7). PCA jsem upřednostnila před výstupy NMDS. Grafy NMDS zobrazovaly data podobně, ale měly vysoké stresové hodnoty. Podobnost lokalit potvrdily i nízké hodnoty R statistiky v analýze ANOSIM. Stejně výsledky přinesla i data abundance.



Obr. 7: Analýza PCA pro data presence/absence druhů na kůrovcových (červené body) a kontrolních (modré body) lokalitách. Měsíc odběru: a) 1. měsíc b) 8. měsíc c) 13. měsíc d) 20. měsíc e) 25. měsíc f) 37. měsíc.

Přítomnost kůrovce objasnila jen malou část variability ve všech odběrech (Obr. 8). Permutační MANOVA přiřadila 30,4 % variability proměnné čas, 1,6 % samostatné proměnné plocha a 0,9 % samostatné proměnné kůrovec při použití dat o abundanci. U binárních dat čas vysvětlil 25,5 % variability, samostatná proměnná plocha 2 % a samostatná proměnná kůrovec 1,3 %. Proměnná kůrovec byla zahrnuta při postupných analýzách v proměnné plocha. Všechny proměnné měly signifikantní vliv na variabilitu v datech.



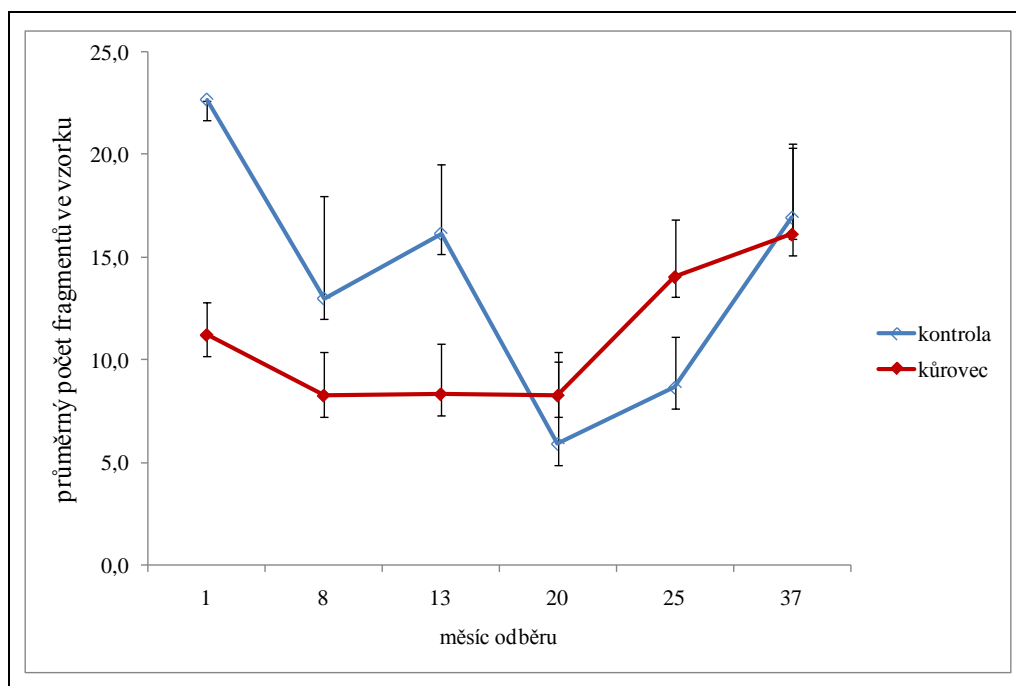
Obr. 8: Rozklad celkové variability v datech permutační analýzou MANOVA. ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***)

4.2 Diverzita hub smrkového opadu v ekosystému po kůrovcové kalamitě – metodou T-RFLP

Ze 180 environmentálních vzorků jehličí z opadových sáčků a z 5 iniciálních vzorků jehličí se mi podařilo izolovat DNA a provést analýzu T-RFLP u 178 vzorků. U zbylých 7 vzorků byla DNA nekvalitní nebo došlo k chybě při izolaci. Během celého pokusu jsem ve vzorcích zaznamenala 122 různě dlouhých fragmentů značených zelenou fluorescenční značkou (fragменты s modrou značkou neuvádím, protože se jejich výpovědní hodnota se zelenou značkou překrývá). Tyto fragmenty můžeme považovat za

samostatné druhy nebo alespoň fylotypy, ale jak ukazuje Příloha 6, některé fragmenty patří dvěma i více druhům.

Počet různých fragmentů ve vzorku se pohyboval od 2 do 29, průměrný počet během 37 měsíců nejdříve klesal a pak stoupal (Obr. 9). Počet fragmentů zjištěných na lokalitě se pohyboval od 17 do 59. Kůrovcové a kontrolní lokality sdílely 64 fragmentů, 45 fragmentů bylo jedinečných pro kontrolní lokalitu a 13 pro kůrovcovou (Tab. 10).

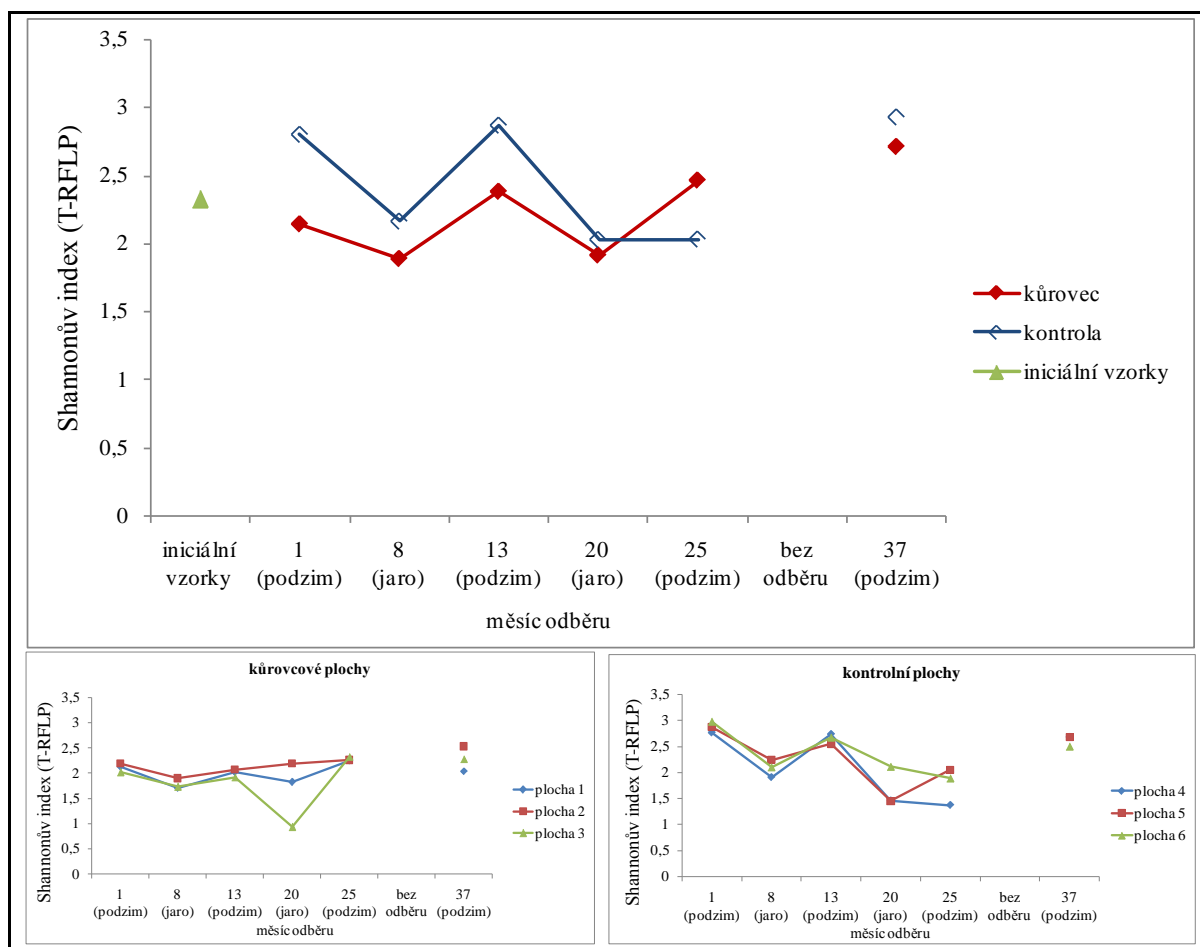


Obr. 9: Změny počtu fragmentů ve vzorku (průměr ± S.D.) na kůrovcových a kontrolních lokalitách během 37 měsíců.

Tab. 10: Délky fragmentů zaznamenané pouze na jedné lokalitě.

Fragmenty jedinečné pro kontrolní lokality					Fragmenty jedinečné pro kůrovcové lokality	
71	105	222	330	377	88	294
76	115	224	331	378	106	324
80	126	231	343	382	133	325
81	128	232	344	383	260	342
83	132	239	348	395	262	354
86	152	240	350	417	282	403
89	158	255	356	438	288	
95	193	314	363	441		
99	195	320	370	448		

Z grafů Shannonových indexů (Obr. 10) je vidět stejný trend jako u výsledků z kultivace; diverzita se snižovala při jarních odběrech. Ke konci tříleté sukcese diverzita na obou lokalitách vzrůstala. Kromě 25. odběrového měsíce byla diverzita kůrovcových ploch nižší než na lokalitách kontrolních. Tyto rozdíly mezi lokalitami byly signifikantní (Tab. 11). Jednotlivé plochy se pak od sebe v diverzitě lišily méně, než jak tomu bylo u výsledků z kultivace. Změny Shannonova indexu v čase byly také statisticky průkazné.



Obr. 10: Shannonův index diverzity fragmentů pro lokality v průběhu 37 měsíců (nahore). Shannonův index diverzity fragmentů pro jednotlivé plochy v průběhu 37 měsíců (dole).

Tab. 11: Výsledky analýzy two way ANOVA pro rozdílnost Shannonova indexu pro faktor čas, přítomnost kůrovce a interakci těchto dvou faktorů.

faktor	F-statistika	p-hodnota
čas	9,288	5,04E-05
kůrovec	8,577	0,007348
interakce	4,515	0,004833

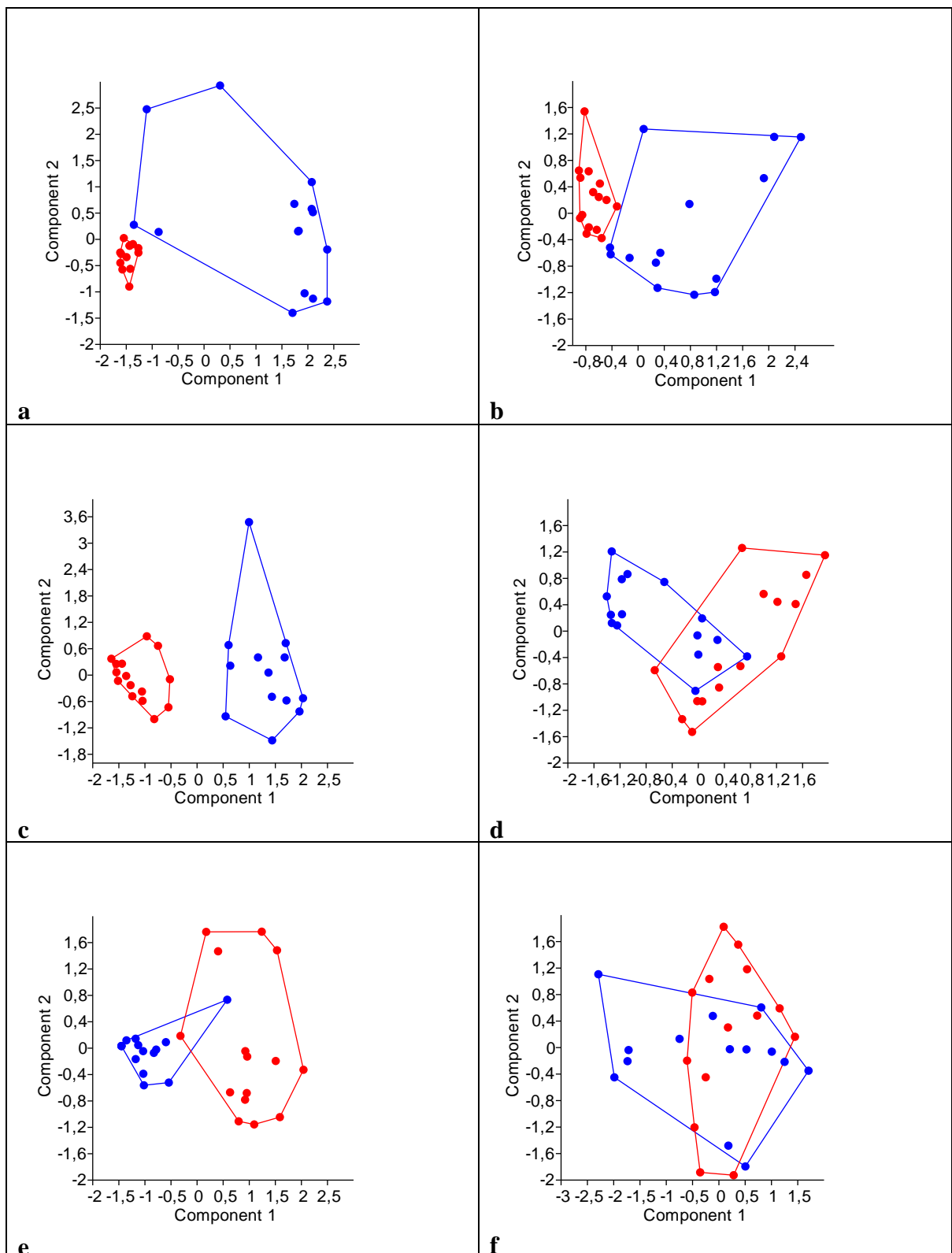
Na rozdíl od dat z kultivace se lokality v analýze PCA poměrně zřetelně oddělovaly a to hlavně v prvních třech odběrech (Obr. 11). ANOSIM prokázal vysokou signifikanci rozdílů u všech odběrů kromě posledního 37. měsíce (Tab. 12, Tab. 13). R hodnoty ukázaly větší rozdíly lokalit pro data presence/absence. Zdá se, že jarní odběry (8. a 20. měsíc) rozdíly mezi lokalitami snižovaly.

Tab. 12: Rozdílnost kůrovcových a kontrolních lokalit v jednotlivých odběrech pro data presence/absence zjištěná analýzou ANOSIM.

měsíc	1	8	13	20	25	37
R statistika	0,6858	0,3976	0,6671	0,3321	0,653	0,0634
p-hodnota	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0796

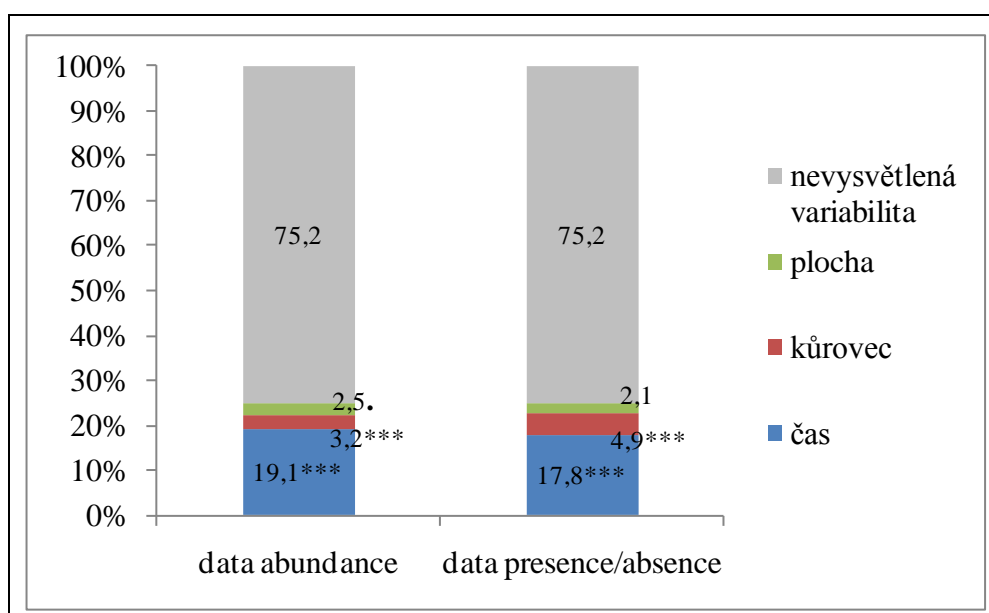
Tab. 13: Rozdílnost kůrovcových a kontrolních lokalit v jednotlivých odběrech pro data abundance zjištěná analýzou ANOSIM.

měsíc	1	8	13	20	25	37
R statistika	0,6441	0,2552	0,5449	0,3094	0,5004	0,04227
p-hodnota	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,1378



Obr. 11: Analýza PCA pro data presence/absence fragmentu na kůrovcových (červené body) a kontrolních (modré body) lokalitách. Měsíc odběru: a) 1. měsíc b) 8. měsíc c) 13. měsíc d) 20. měsíc e) 25. měsíc f) 37. měsíc.

Přítomnost kůrovce objasnila mnohem více z celkové variability, než tomu bylo u výsledků z kultivace (Obr. 12). Při použití dat o abundanci permutační MANOVA přiřadila 19,1 % variability proměnné čas, 2,5 % samostatné plocha a 3,2 % samostatné proměnné kůrovec. U binárních dat čas vysvětlil 17,8 % variability, samostatná proměnná plocha 2,1 % a samostatná proměnná kůrovec 4,9 %. Proměnná kůrovec byla zahrnuta při postupných analýzách v proměnné plocha. Vliv plochy tentokrát nebyl průkazný, ale proměnná čas a přítomnost kůrovce měly znovu vysoce signifikantní vliv na variabilitu v datech.

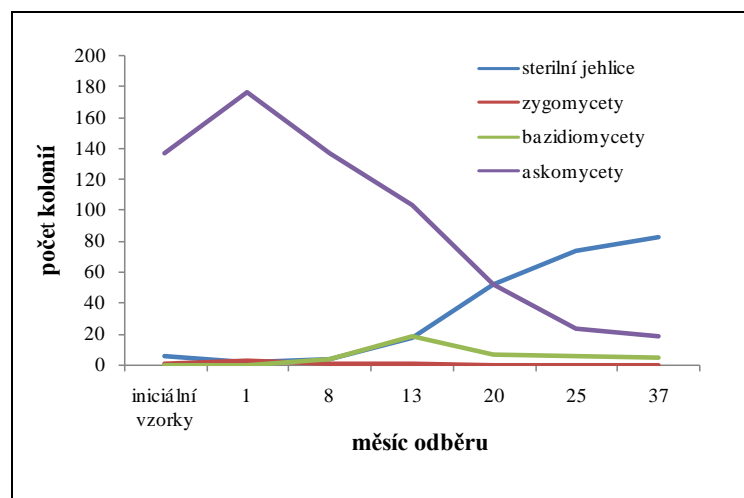


Obr. 12: Rozklad celkové variability v datech permutační analýzou MANOVA. ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$)

4.3 Sukcese hub na smrkovém opadu v ekosystému poškozeném kůrovcem – metoda kultivace

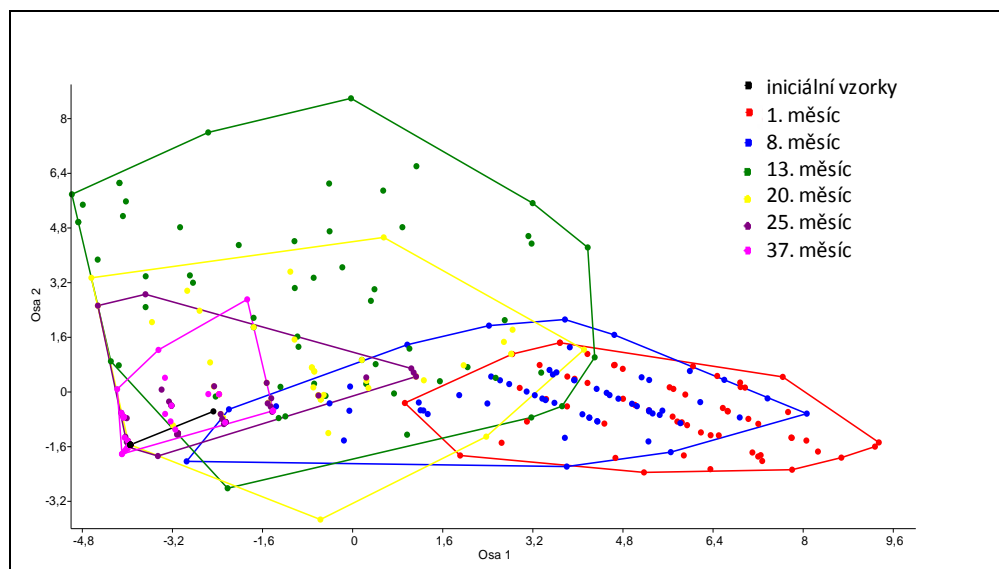
V průběhu 37 měsíců se výrazně měnilo zastoupení hlavních skupin hub (Obr. 13). Tyto změny byly podobné pro kontrolní i kůrovcové lokality. Počet kolonií askomycetů po prvním měsíci prudce klesal a společenstvo pak začalo být doplňováno bazidiomycety, kteří ale nepřesáhly četnost 23 %. Zygomycety se vyskytovaly hlavně na začátku sukcese, ale pouze ve velmi nízkých počtech kolonií. Nárůst počtu sterilních jehlic by mohl souviset

s postupným narušováním struktury jehlice během dekompozice a následným prostupováním peroxidu vodíku hlouběji do pletiva při sterilizaci.



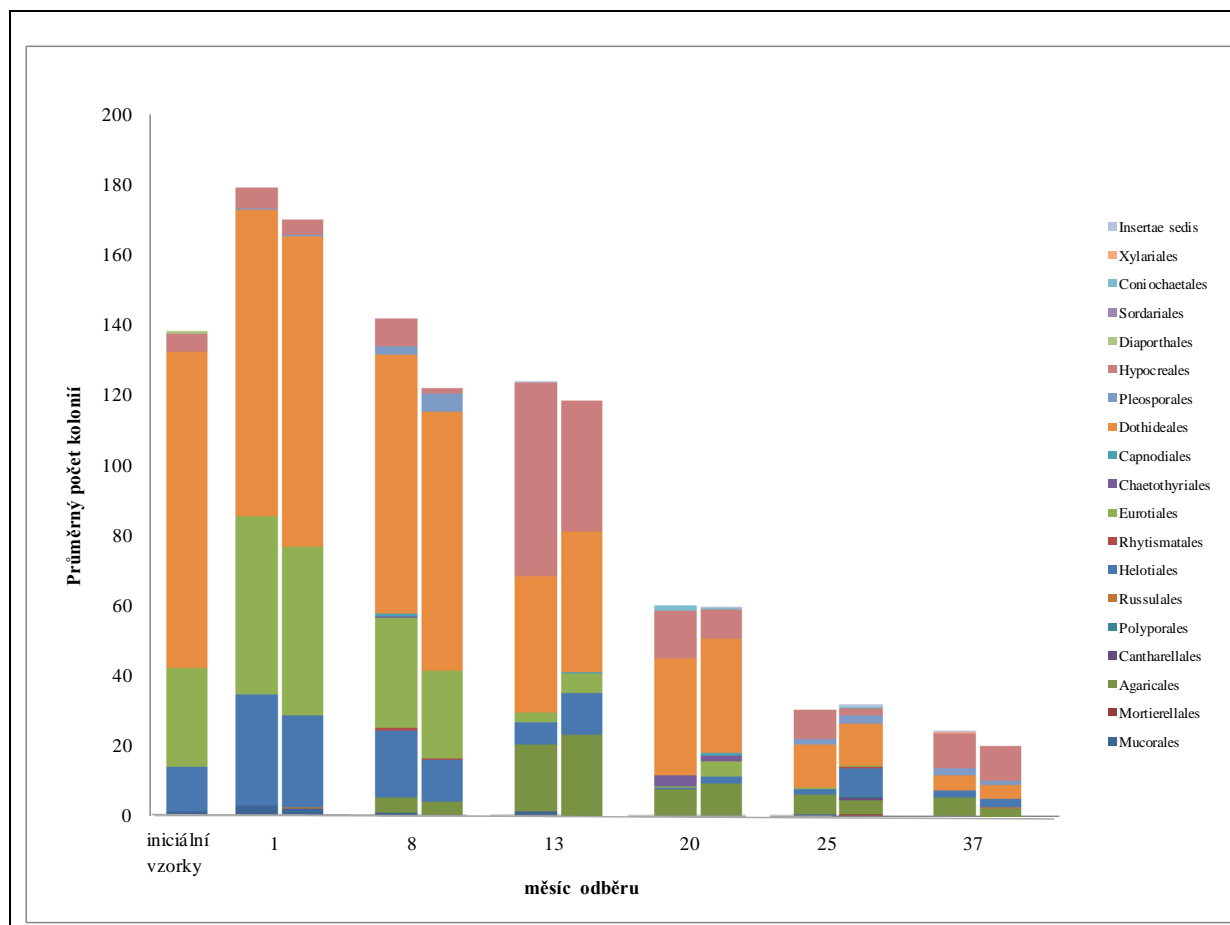
Obr. 13: Změna zastoupení hlavních skupin hub na kontrolních lokalitách v čase. Osa y znázorňuje počet kolonií a také počet sterilních jehlic.

V zobrazení analýzy PCA (Obr. 14), ve které jsou sloučena data z obou lokalit, vidíme pomalé změny v přítomnosti druhů ve společenstvu a neustálý překryv druhového složení.



Obr. 14: Analýza PCA pro presenci/absenci druhů v jednotlivých odběrech. Data jsou sloučena pro kůrovcové i kontrolní lokality.

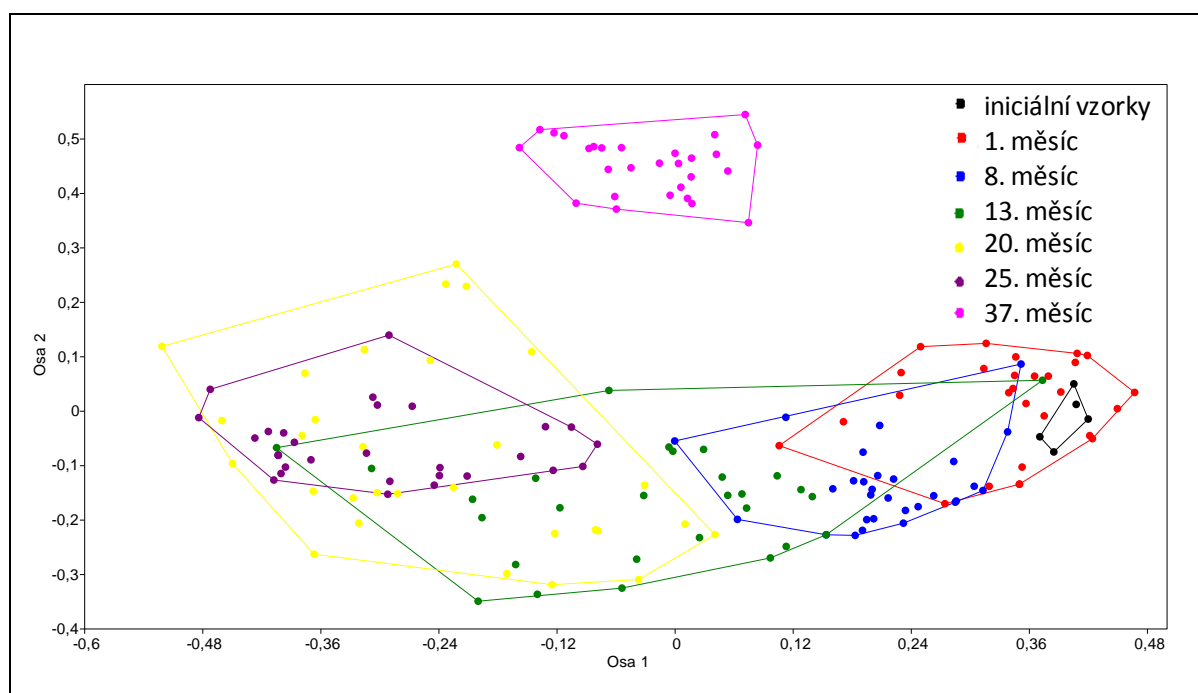
Po dobu všech odběrů dominoval společenstvu řád Dothideales, což způsoboval hlavně druh *Scleroconidioma sphagnicola* (v prvním měsíci pokrýval až 84% jehlic, Obr. 15). V prvních 8 měsících ji v tomto řádu doplňovala také *Hormonema dematiodes*. Druhým dominantním řádem na začátku sukcese byl řád Eurotiales. Tento řád zastupoval ve většině případů druh *Thysanophora penicilliodes* (v prvním měsíci pokrýval až 50% jehlic), ale jeho četnost do konce prvního roku výrazně poklesla, a po roce a půl zmizel úplně. Dalšími častými druhy byly v prvních 8 měsících *Ceuthospora pinastris* a *Chalara longipes* z řádu Helotiales. Po jednom roce významně vzrostl podíl řádu Hypocreales, což způsoboval převážně rod *Trichoderma*, zejména druh *Trichoderma polysporum* (až 40% v 13. měsíci). Po jednom roce se mezi četné druhy řadila také *Mycena galopus* a další druh rodu *Mycena* z řádu Agaricales. V druhém roce zůstalo složení podobné, ale po 25 měsících se znovu zvýšil podíl řádu Helotiales, tentokrát především přítomností druhů *Chalara hyalocuspica* a blíže neurčeného druhu Helotiales sp. 1. V třetím roce byly již změny pomalejší a v průměru bylo kolonizováno pouze 17 jehlic ze 100. Složení společenstva na konci sukcese tvořily vyrovnaně druhy Hypocreales sp., *S. sphagnicola*, *Trichoderma* spp. a *M. galopus*.



Obr. 15: Průměrný počet kolonizovaných jehlic jednotlivými řády na lokalitách od počátku instalace opadových sáčků. Osa x znázorňuje čas v měsících, první sloupec ve dvojici patří kůrovcovým plochám, druhý kontrolním. Osa y znázorňuje průměrný počet kolonií hub na lokalitě.

4.4 Sukcese hub na smrkovém opadu v ekosystému poškozeném kůrovcem – metoda T-RFLP

Sloučená data z obou lokalit (Obr. 16) vykazují v čase podobnou strukturu jako data z kultivace. Jen poslední odběr (37. měsíc) se výrazně oddělil od zbytku. Po přibližné identifikaci hlavních píků v T-RFLP profilech se dá také předpokládat, že obě použité metody zjistily stejné dominantní druhy (Příloha 7).



Obr. 16: Analýza PCA pro presenci/absenci fragmentů v jednotlivých odběrech. Data jsou sloučena pro kůrovcové i kontrolní lokality.

Metoda T-RFLP potvrdila na začátku sukcese přítomnost druhů *Scleroconidioma sphagnicola*, *Thysanophora penicillioides*, *Cethospora pinastri*, *Hormonema dematioides* a druhy rodu *Chalara*. T-RFLP odhalila, na rozdíl od kultivace, již od prvního měsíce různé fylotypy rodu *Mycena*, které pak byly od prvního až do třetího roku sukcese zaznamenány v hojných počtech. Náhlý nárůst druhu *Trichoderma polysporum* byl po prvním roce sukcese také viditelný. V ostatních odběrech byl tento druh zaznamenán již v malých množstvích, přitom během kultivace dominoval až do konce experimentu. Blíže neurčený druh Helotiales sp. 1, který jsem zaznamenala při kultivaci od 25. měsíce, byl pomocí T-

RFLP zjištěn nejspíš už mnohem dříve, i když v malých množstvích. Na konci sukcese zaznamenala T-RFLP také druh *Chalara hyalocuspica*. Blíže neurčený druh *Hypocreales* sp. byl v 37. měsíci možná zjištěn, ale pouze v malých množstvích.

5 Diskuze

5.1 Metodika kultivace

Použitím této tradiční metody v kombinaci s molekulární identifikací kmenů jsem mohla většinu kmenů identifikovat alespoň do vyšších taxonomických jednotek. Sterilní mycelia tak nezůstala pod velmi obecnými názvy, nebo jen čísla, jak tomu bývalo ve studiích starších a i některých novějších (Przybył *et al.* 2008). U převažujících druhů se dá předpokládat, že se ve vyšší míře účastní koloběhů živin nebo determinují společenstvo jako celek svou životní strategií (silní kompetitoři, fungikolní druhy). Pro zjednodušení tohoto přístupu by bylo možné určovat jen hojné morfotypy, ale u některých morfotypů se ukáže až výsledným sloučením záznamů, že se jedná o četnější druh. Pokud nás navíc zajímá posun společenstva v čase je potřeba zaznamenat i minoritní druhy, jejichž počty se mohou v dalším odběru rapidně zvýšit.

Nedostatkem v metodice, který souvisí spíše s mou nepředvídavostí, než s podstatou kultivačních metod, bylo použití sterilizační techniky. S velkou pravděpodobností jsem některé cílové druhy odstranila nepřiměřeně silnou povrchovou sterilizací. Použití peroxidu vodíku se zdá být velmi vhodné pro odstranění povrchových spor v prvních odběrech (Kinkel a Andrews 1988), kdy jehlice měly ještě silnou ochrannou vrstvu, ale v pozdějších fázích sukcese se peroxid mohl dostat do kontaktu i s vnitřními kolonizátory. Dobu sterilizace by tedy bylo lepší postupně zkracovat, nicméně každá jehlice podléhá rozkladu jinak rychle, takže vždy budou některé jehlice sterilizované více jiné méně.

Vzhledem k tomu, že získané kmeny byly často dlouho sterilní (řádově měsíce až roky), byla jejich morfologická identifikace nemožná. Proto jsou některé druhy z posledních odběrů určeny jen do vyšších taxonomických jednotek na základě DNA. Speciálně u bazidiomycetů lze identifikaci provést pouze molekulárně. Tento problém je u kultivačních metod často diskutován (Jones a Hyde 2002). Také určovací literatura pracuje v mnoha případech s popisem teleomorfních stádií přímo ze substrátu a ne s anamorfními stádii těchto druhů, které při izolaci na agarové médium převládají. Dalším problémem, který nejspíš snížil počet zjištěných druhů metodou kultivace, byl rychlý růst některých druhů na miskách. Jednalo se zejména o druh *Trichoderma polysporum* a

Scleroconidioma sphagnicola. *T. polysporum* navíc velmi rychle sporuluje a kontaminoval tak často další izolované kmeny. V tomto případě by bylo vhodné, abych jehlice nakrájela na menší fragmenty a ty pak vysévala na misky v menším množství, abych předešla přerůstání rychlejších druhů (Söderström a Bååth 1978), tím by bohužel vzrostla i náročnost celého zpracování. Běžně se také vyřezávají rychle rostoucí kolonie z misky (nebo naopak ty pomalu rostoucí), ale to není ve všech případech účinné.

Více kolonií jednoho morfotypu bylo bráno jako jeden druh a jedna kolonie, i přes to že jehlici může kolonizovat několik geneticky rozdílných jedinců jednoho druhu (Müller *et al.* 2001). Zanedbala jsem tak i možnou přítomnost kryptických druhů. Odhadnout frekvenci této skryté diverzity je zatím složité (Schmit a Mueller 2007). U některých skupin hub by to mohl být pěti-, nebo i vyšší násobek druhů, než v současnosti známe (Hawksworth a Rossman 1997). Tento problém by vyřešila jediné molekulární identifikace všech kolonií spojená s izolací DNA až z tisíce jednotek v jednom odběru.

5.2 Metodika T-RFLP

Tato metoda je široce doporučována a využívána pro odhalení rozdílů mezi mikrobiálními společenstvy (Rumberger *et al.* 2007, Bennett *et al.* 2009, Joo *et al.* 2010, Lee *et al.* 2010). Poměrně rychle a jednoduše jsem díky ní zjistila, zda se sledované lokality liší a k jakým přibližným změnám v jejich struktuře dochází.

Prvotním cílem nebylo popsat do detailů rozdíly mezi metodou kultivace a T-RFLP a protože byl pro každou metodu použit jiný počet a objem vzorků lze je jen hrubě porovnat. V postupu metody T-RFLP jsem používala povrchově nesterilizované jehličí a možná i díky tomu je množství „odlišitelných fylogypů“ z této metody vyšší. Peršoh *et al.* (2012) získali metodou RFLP skoro dvojnásobné množství RFLP typů z nesterilizovaných listů buku oproti listům sterilizovaným. I když v mém případě metoda T-RFLP odhalila vyšší diverzitu hub než u dat z kultivace, Allmér (2005) touto metodou získal ze smrkového dřeva pouze 5 druhů hub, a za více efektivní tak považoval přímé sledování plodnic v terénu, při čemž se objeví více vzácných druhů než při T-RFLP. T-RFLP zaznamená spíše aktivní druhy.

Při pokusu o identifikaci jednotlivých fragmentů získaných touto metodou jsem narazila na problémy, o kterých se zmiňuji v úvodu. Některé píky byly tvořeny fragmenty

více druhů, naopak některé druhy mohly tvořit více fragmentů, k jejichž vzniku dochází bodovou mutací v místě restrikce a DNA se potom štěpí v následujícím restrikčním místě (Edwards a Turco 2005). Druh *Mucor hiemalis f. corticola* ani restrikční místo pro použitý enzym nemá a proto jej metoda nemohla zachytit, možná jako i další druhy (Joo *et al.* 2010). U druhů hub, které jsem přiřazovala k fragmentům jen podle virtuálního štěpení, bylo nutné virtuální délku o 1 až několik bází snížit, což jsem usoudila z rozdílů mezi virtuálním a reálným štěpem u několika vybraných druhů. Příbuzné druhy někdy bylo možné odlišit, ale většinou měly velmi podobné délky fragmentů. Na úkor identifikace hub z kultivace jsem při metodě T-RFLP nepostupovala tak důkladně a jistě by bylo vhodné použít k získání přesnějšího profilu komunity štěpení více enzymů (Clement *et al.* 1998). Jako klíčové považuji u častých kmenů získaných z kultivace použít restrikci DNA metodou T-RFLP pro srovnání s T-RFLP environmentální DNA. V některých sporných případech by to usnadnilo přiřazení fragmentu konkrétnímu druhu.

Pro vizualizaci výsledků a statistické analýzy jsem použila jak data o presenci/absenci, tak data o abundanci. Někteří autoři pro vyhodnocení používají pouze binární data, protože hodnota abundance fragmentu nemusí odrážet pravou abundanci organismu v důsledku odlišné amplifikace DNA při PCR, odlišnému množství kopií ITS rDNA v genomu různých druhů hub a kvůli různému množství genomu na jednotku biomasy hub (Clement *et al.* 1998, Dickie a FitzJohn 2007, Schütte *et al.* 2008, Joo *et al.* 2010). To souvisí i s otázkou nevhodnosti používání indexů diverzity pro T-RFLP data. Blackwood *et al.* (2007) například doporučuje používat mnohem citlivější mnohorozměrné metody místo indexů diverzity. Naopak Lee *et al.* (2010) používají k porovnání mikrobiálních komunit vzduchu jak mnohorozměrné metody, tak i Shannonův index. V mém případě byly výsledky z obou typů dat podobné, z dat presence/absence dokonce robustnější. Shannonovy indexy by tedy mohly pravdivě zobrazovat reálnou situaci ve společenstvu. Ale vzhledem k tomu, že nejsem schopná přesně pojmenovat fragmenty z restrikčních profilů, bylo by třeba se této identifikaci ještě více věnovat a případně potvrdit rozdíly zjištěné indexy diverzity.

5.3 Kombinace metody kultivace a T-RFLP

Použití pouze jedné metodiky by mohlo vést ke špatné interpretaci výsledků, protože kultivace druhovou diverzitu možná částečně podhodnotila, T-RFLP naopak nadhodnotila. Takto jsem mohla sloučit jejich výhody. Kultivace byla podstatná pro získání kultur hub a zjištění četnosti jednotlivých druhů, což umožnilo identifikaci fragmentů v restričních profilech. Naopak samotná kultivace nebyla schopná dostatečně odhalit rozdíly mezi různými podmínkami lokalit. Metodou T-RFLP jsem dospěla k zajímavým výsledkům, ale je stále třeba brát v úvahu různá úskalí PCR a nepředvídatelnost vnitrodruhové variability.

5.4 Diverzita a sukcese hub smrkového opadu

Celkově mohu na zkoumaných lokalitách potvrdit 71 druhů hub ze smrkového opadu, což je číslo nejspíše podhodnocené pokud je srovnáme se 122 možnými druhy zaznamenanými z T-RFLP. Obě metody mají určitý překryv druhů a předpokládám, že mnoho druhů nebyla schopna zachytit ani jedna z nich. V odlišení kůrovcových a kontrolních lokalit se obě metody výrazně lišily. U kultivace se vliv kůrovce na variabilitu dat prokázal až při sloučení všech odběrů. Naopak analýza T-RFLP jasně odlišila kůrovcové a kontrolní lokality už v jednotlivých odběrech. Rozdíl v druhovém složení lokalit byl nejspíš v první polovině tříletého sledování, kdy se dá u kontrolní lokality očekávat doznívající charakter neovlivněného lesa. Na kůrovcových lokalitách nebyl před experimentem několik let obnovován čerstvý smrkový opad, který by mohl udržovat určitou diverzitu hub, která je s ním spojována. Tím si vysvětluji nižší indexy diverzity zjištěné analýzou T-RFLP. Indexy diverzity z dat zjištěných kultivací byly v prvních dvou měsících na kůrovcových lokalitách vyšší, ale rozdíly nebyly statisticky průkazné.

Jelikož diverzitu hub ovlivňují významně klimatické a mikroklimatické podmínky (Unterseher a Tal 2006, Unterseher *et al.* 2007), je srovnávání výsledků mezi různými studii složitější, protože bývají prováděny v různých nadmořských výškách, v různě starých porostech s různou hustotou zápoje apod. Druhou překážkou ve srovnání jsou odlišné metodické přístupy.

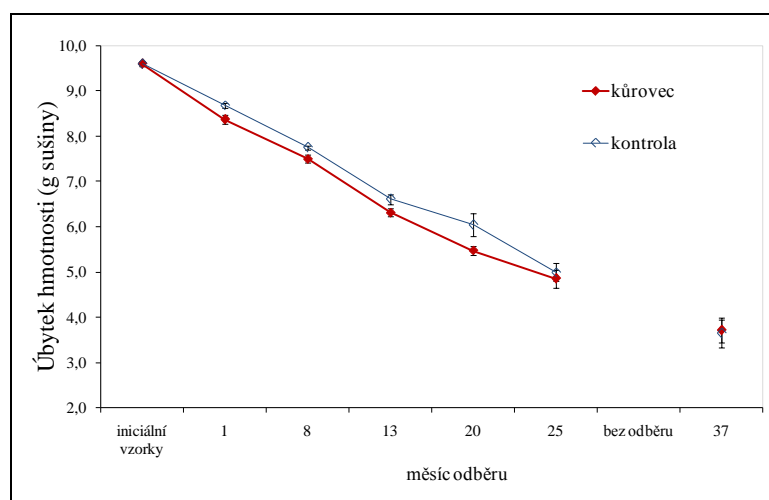
Jediná práce, která se zabývá diverzitou hub ve smrkovém opadu na lokalitě poškozené kůrovcem je polská studie Przybył *et al.* (2008). Jejich výsledky lze srovnat s mými iniciačními vzorky, jelikož kultivovali pouze jehlice opadané z napadených stromů. Jako nejčastější druhy uváděli *Phomopsis occulta*, *Penicillium purpurogenum*, *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* a *Hormonema dematioides* a 4 nesporující kmeny. Když pokus následující rok opakovali, získali odlišné společenstvo tj. *Alternaria alternata*, *Mucor plumbeus*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger*, *A. pullulans*, *C. herbarum*, 2 coelomycety a 6 nesporujících kmenů hub. Druh *Thysanophora penicillioides*, který byl častý v mých odběrech, zaznamenali pouze v 1 a 2 koloniích. Nepodobnost druhového složení s mými výsledky, bude nejspíš způsobena nízkou nadmořskou výškou lokality tj. 150 m, nízkými srážkovými úhrny tj. 591 mm a možná způsobem sterilizace jehlic a typem agarového média (4,8% MEA). Sami autoři vysvětlují rozdíly ve svých výsledcích meteorologickými faktory, kdy byl druhý rok bohatší na srážky.

Pokud bych měla srovnat mé výsledky s prací Söderström a Bååth (1978), kterou považují za jednu ze základních zdrojů k tomuto tématu, shodují se např. v druzích *Trichoderma polysporum*, *T. viride*, *Umbelopsis ramanniana*, *Cylindrocarpon magnusianum*, *Chalara longipes*, *Thysanophora penicillioides*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium canescens* a *P. spinulosum*. To jsou ale většinou druhy opurtunni a dobře sporující, které jsem primárně měla v zájmu odstranit povrchovou sterilizací a až na rod *Trichoderma* se vyskytovaly v odběrech zřídka. Autoři používali místo povrchové sterilizace pouze opláchnutí jehlic vodou.

Počet taxonů, které jsem získala během odběrů i celkově, je srovnatelný i s jinými pracemi. Kubartová *et al.* (2009) zjistili metodou TGGE po 4 měsících (jarní odběr) dekompozice smrkového opadu průměrně 12 druhů hub, po 24 měsících (podzimní odběr) 11 druhů. Já jsem po 8 měsících (jarní odběr) zaznamenala průměrně 12 druhů na kontrolní lokalitě a 20 druhů na kůrovcové, po 25 měsících (podzimní odběr) to bylo na obou lokalitách 16 druhů. Kubartová *et al.* (2009) také uvedli, že rychlost dekompozice opadu nemusí být nutně korelována s diverzitou hub, roli hrají spíš výživové hodnoty opadu dohromady s biotickými interakcemi, a aktuální aktivita druhů v závislosti na environmentálních podmínkách. To potvrzují data úbytku biomasy jehličí v opadových

sáčcích (Obr. 17, Štursová nepublikovaná data), která ukázaly mírně rychlejší dekompozici na kůrovcových lokalitách, které byly podle výsledků T-RFLP druhově chudší.

To že se diverzita v mých odběrech na konci experimentu zvyšovala a to u obou použitých metod je jev, který nejspíš nelze zobecnit a závisí na komplexních podmínkách prostředí (kvalita opadu, diverzita bylinného patra, vlastnosti půdy, klima, biotické interakce...). Pokles diverzity v některých odběrech může být také způsoben převládáním několika druhů, kteří sníží relativní četnost druhů vzácnějších (Peršoh *et al.* 2012). Při dekompozici borového opadu (Lindahl *et al.* 2007) se počet druhů během tří let postupně zvyšoval. Naopak diverzita bukového opadu se během dekompozice měnila různě, nejdřív klesala a ve velmi dobře rozloženém opadu zase začala stoupat (Peršoh *et al.* 2012). Fakt, že abundanci druhů i diverzitu ovlivnily i samostatné plochy lokalit (v některých odběrech se 1 plocha od ostatních odlišovala u dat z kultivace i T-RFLP), potvrzuje pokus na čerstvě pokáceném dřevu. Dvě zkoumané plochy, vzdálené pouze 100 m se lišily významně ve struktuře společenstva, což ukazuje na důležitost lokálního zdroje spor a kompozici terénu resp. krajiny (Vasiliauskas *et al.* 2005). Peršoh *et al.* (2012) také poukázali na nerovnoměrné zastoupení druhů ve vzorcích, které může být ovlivněno v každém vzorku jiným parametrem podle lokální charakteristiky prostředí.



Obr. 17: Úbytek biomasy jehličí v opadových sáčcích na kůrovcových a kontrolních lokalitách během 37 měsíců (Štursová, nepublikovaná data).

Vliv sezóny na změnu diverzity lokalit jsem statisticky netestovala kvůli nestejnému počtu jarních a podzimních odběrů, ale myslím, že je z výsledků dobře patrné snížení diverzity v jarních odběrech. Podobný trend byl v ČR zaznamenán na borovicovém opadu (Koukol 2002). Vyšší četnost v podzimních odběrech jsem zaznamenala například u rodu *Chalara*. Sezónní změny v četnosti různých druhů hub z jehličnatého opadu popsal Tokumasu (1998). V jeho studii byl neurčený druh rodu *Chalara* přítomen z celého roku pouze v říjnových a listopadových odběrech. Zvýšení diverzity hub v podzimních měsících může být způsoben dosažením optimálních vlhkostních podmínek (Przybył *et al.* 2008)

Zajímavé je, že během celého experimentu jsem zaznamenala pouze 4 kolonie druhu *Lophodermium piceae*, který bývá častý jak v čerstvých, tak opadových jehlicích různých druhů smrků (Müller *et al.* 2001, Stefani a Bérubé 2006, Sokolski *et al.* 2007, Korkama-Rajala *et al.* 2008). *L. piceae* nebylo na sledované lokalitě zaznamenáno v hojných počtech ani na jehlicích z klestí (Koukol *et al.* 2012). Podobně Przybył *et al.* (2008) uvádí pouze jednu kolonii tohoto druhu při kultivaci jehlic na MEA, ale vzhledem k tomu, že při kultivaci stejných vzorků ve vlhkých komůrkách zjistili až 67% frekvenci *L. piceae*, může být tento rozdíl silně ovlivněn metodou zpracování vzorků. Lehtijärvi a Barklund (1999) pozorovali snížení frekvence *L. piceae* na jehlicích *P. abies* na lokalitách zavlažovaných, a hnojených síranem amonným. Tento druh také negativně koreluje s kyselými dešti (Barklund a Rowe 1983, Solheim 1989). Pro srovnání s výsledky T-RFLP jsem *L. piceae* virtuálně naštěpila. Tento druh by měl tvořit fragment dlouhý 349 bazí, ale je možné, že reálné štěpení je kratší. V prvních odběrech je v těchto místech jen velmi slabý signál, což nepřítomnost *L. piceae* potvrzuje. Přitom oba známé druhy *L. piceae* a *L. pinastri* pozitivně korelují s chladnějším klimatem (Gourbière *et al.* 2001, Scattolin a Montecchio 2009). Nepřítomnost toho druhu by tedy mohla být způsobena ovlivněním lokality znečištěním nebo kompeticí s jiným endofytním druhem už na stromě.

Také *Marasmius androsaceus* je častým kolonizátorem smrkového a borovicového opadu (Mitchell a Millar 1978, Ponge 1991, Holec 2000, Koukol *et al.* 2008), ale v mém případě se objevil pouze v několika koloniích během prvního roku dekompozice. Zde došlo nejspíš ke špatnému odlišení tohoto druhu od ostatních bazidiomycetů, protože v restričním profilu T-RFLP lze rozeznat. Jeho četnost však není nijak vysoká.

5.5 Abundantní druhy

Kůrovcové a kontrolní lokality se v přítomnosti abundantních druhů nelišily, ale u některých druhů lze pozorovat rozdílnost v jejich četnosti. Například *Hormonema dematiodes* se vyskytovala více na kontrolních stanovištích, což potvrzují i výsledky z T-RFLP. Naopak velmi zajímavé jsou zvýšené počty druhu *Trichoderma polysporum* na kůrovcových lokalitách. Tento trend sice není patrný v datech z T-RFLP, ale je možné že abundance tohoto druhu zaznamenala metoda ne úplně přesně. Stejně tak se zdá být na kůrovcových lokalitách více častá *Ceuthospora pinastri*, což je patrné z obou metod. V následujícím textu se budu věnovat těmto a dalším četným druhům v kontextu s literárními záznamy.

Nejčetnější druh odběrů *Scleroconidioma sphagnicola* je zatím popisován jen z velmi málo oblastí. Tento tmavý anamorfní druh byl popsán v roce 2000 z nekrotických pletiv mechorostu *Sphagnum fuscum* z rašelinišť Kanady (Tsuneda *et al.* 2000). Koukol a Kovářová (2007) izolovali *S. sphagnicola* také ze smrkového a borovicového opadu v NP Šumava. Vasiliauskas *et al.* (2005) našli tento druh také na smrkovém dřevě. Jeho distribuce se zdá být zatím roztroušená; byl izolován z jehličí jak z hor, tak z nížin, z přirozených i hospodářských stanovišť a z různě starých porostů. Při porovnání sekvencí s databází GenBank byl tento druh (nebo alespoň rod) přiřazen také k záznamu z vřesovcovité rostliny *Gaultheria shallon*, k záznamu z půdy pod *Pinus contorta* a byl dokonce nalezen v kořenových vláscích keře *Rhododendron lochiaie* v australském deštném lesu (Koukol 2009). V roce 2011 byla *S. sphagnicola* izolována v Číně z opadu stálezeleného listnatého lesa (acc. number JN628103.1). Efekt tohoto druhu na dekompozici se ukázal jako zanedbatelný (Koukol *et al.* 2006a), i přes to, že produkuje lakázu, polyfenol oxidázu a peroxidázu (Koukol a Kovářová 2007). To, že jsem *S. sphagnicola* izolovala ve vysokém množství, potvrzuje fakt, že má dobré kompetiční schopnosti vůči jiným askomycetům (Koukol *et al.* 2006b), což může být mimo jiné způsobeno tvorbou melaninu a celkovou odolností vůči biotickým a abiotickým podmínkám díky mikrosklerociím¹⁷ (Koukol a Kovářová 2007). I když zatím neznáme reálné rozšíření tohoto druhu, a je možné že v starších studiích došlo k záměně

¹⁷ mikrosklerocia = útvary vznikající isodiametrickým zvětšením buňky, která se následně rozdělí a vytváří bublinovité výběžky oddělené septy; celá struktura je tmavě pigmentovaná (Hambleton *et al.* 2003)

s podobnými druhy (Koukol 2009), dá se z překvapivé četnosti až 84% kolonizovaných jehlic usuzovat, že podmínky horské smrčiny nebo dokonce konkrétně podmínky Šumavy jsou pro něj velice optimální.

Thysanophora penicilliodes je nacházena již jako endofyt smrkových jehlic. Müller a Hallaksela (1998) ji zaznamenali dokonce jako třetí nejčetnější druh v živých jehlicích *P. abies*. V jejich další práci (Müller a Hallaksela 2000) kdy zkoumali různé části smrku, potvrdili její přítomnost pouze uvnitř jehlic. Známa je také jako endofyt *Picea glauca* (Stefani a Bérubé 2006). Je to druh hojný i na jiných jehličnanech jako jsou rody *Abies*, *Pseudotsuga*, *Tsuga* (van Maanen a Gourbière 1997) nebo *Pinus* (Tokumasu 1998). Její vliv na dekompozici jehličnatého opadu je prokazatelný a jako endofyt je schopna stejně dobře rozkládat i zelené jehlice (Koukol *et al.* 2008, Žifčáková *et al.* 2011).

Druh *Hormonema dematioides* je uváděn z opadu jehličnanů často např. ve zmiňované studii Przybył *et al.* (2008) nebo Müller a Hallaksela (2000) a Müller *et al.* (2001), kde používali synonymní název *Sclerophoma pythiophyla*. V současnosti je *H. dematioides* známa jako patogen způsobující nekrózu jehlic rodu *Abies* (Talgø *et al.* 2010). Také byl nalezen na větvičkách *P. abies* (Sieber 1989, Müller a Hallaksela 2000). Může způsobovat významné ztráty biomasy jehlic, ale její dekompoziční schopnosti pravděpodobně závisí na daném kmenu (Boberg *et al.* 2011, Žifčáková *et al.* 2011).

Ceuthospora pinastri je známá hlavně z borovicového opadu a jako endofyt borovicových jehlic (Hayes 1965, Widden a Parkinson 1973), ale běžně se vyskytuje také jako endofyt jiných jehličnanů např. na *Abies grandis* nebo *P. abies* (Hayes 1965). I tento druh se významně podílí na rozkladu jehličí (Žifčáková *et al.* 2011).

Anamorfní rod *Chalara* je znám jako saprotrof na rostlinném opadu a také jako parazit stromů nebo lišejníků (Koukol 2011). Z jehličnatého opadu je často uváděn druh *C. longipes* (Söderström a Bååth 1978, Aoki a Tokumasu 1995, Koukol *et al.* 2012), u kterého byla popsána velmi dobrá schopnost využívat huminové kyseliny ze smrkového opadu (Koukol *et al.* 2004). V rámci ostatních askomycetů tento druh poměrně dobře rozkládá borovicový opad (Boberg *et al.* 2010), ale v opadu jiných jehličnanů taková schopnost nebyla prokázána (Osono a Takeda 2006, Koukol *et al.* 2006).

Přítomnost rodu *Trichoderma* ve smrkovém opadu je typickým jevem a jako oportunní r-stratég a silný kompetitor se také vyskytuje ve velkém množství (Widden a

Scattolin 1988). Na dekompozici opadu se podílí svými celulázami (Rabinovich *et al.* 2002). *T. polysporum* lépe snáší chladnější teploty (Tokumasu 1998) a inhibuje některé ostatní druhy rodu *Trichoderma* ze smrkového opadu nehledě na teplotní podmínky a sama je méně inhibována v chladnějších teplotách (Widden a Scattolin 1988). Chladné podnebí hor NP Šumava vysvětluje převládnutí *T. polysporum* nad ostatními druhy tohoto rodu. Nicméně vyšší četnosti *T. polysporum* na kůrovcových lokalitách pak ale nekorespondují s o něco menšími povrchovými teplotami na kontrolních plochách (Baldrian, nepublikovaná data). Méně markantní záznam *T. polysporum* v restriktivním profilu T-RFLP potvrzuje i Allmér (2005), který je nenašel v T-RFLP profilech i když byla častá v izolacích z kultur.

Saprotrofní bazidiomycet *Mycena galopus* je běžný druh mírného pásu severní polokoule, který se významně podílí na rozkladu jehličnatého i listnatého opadu. *M. galopus* se neomezuje na jednotlivé zdroje živin a v homogenním jehličnatém opadu se dobře rozrůstá a fruktifikuje (Frankland 1998). Na opadu *P. abies* jsou známy další druhy tohoto rodu např. *M. alphitophora*, *M. vulgaris*, *M. sanguinolenta*, *M. stylobates*, *M. pura*, *M. aurantiidisca*, *M. amicta* (Miyamoto 2000) nebo *M. epipterygia* (Allmér *et al.* 2006). Některé z nich mohly být v mých odběrech také přítomny, ale při kultivaci jsem je nemusela odlišit od *M. galopus*.

Sekvence blíže neurčeného druhu **Helotiales sp. 1** byla nejbližší podobná druhu *Meliniomyces* sp. *Meliniomyces* je anamorfní rod spadající do mykorhizního agregátu *Rhizoscyphus ericae*. Je znám z kořenů erikoidních rostlin a z kořenů jehličnatých i listnatých stromů (Hambleton a Sigler 2005). Mykorhizní schopnosti tohoto rodu jsou zatím předmětem výzkumu (Ohtaka a Narisawa 2008). Některé druhy tvoří ektomykorhizu, některé tvoří erikoidní mykorhizu, nebo jsou jen endofytní (Grelet *et al.* 2010).

6 Závěr

1) V diplomové práci jsem se zaměřila na diverzitu hub jehličnatého opadu horské smrčiny poškozené kůrovcem a jejich sukcesi během tříletého experimentu. Pro výzkum jsem použila tradiční kultivační metodu na agarovém médiu a molekulární metodu T-RFLP, čímž jsem chtěla sloučit jejich výhody k získání přesnějšího odhadu diverzity lokalit.

2) Na studovaných lokalitách jsem zaznamenala charakteristické druhy spojované se smrkovým opadem včetně druhů vzácnějších, souvisejících s danými podmínkami lokalit. Specifickým druhem byl v tomto případě hlavně druh *Scleroconidioma sphagnicola*.

3) Sukcesní změny houbového společenstva v čase byly dobře patrné. Primárními saprotrofy na smrkovém opadu byly např. *Thysanophora penicillioides*, *Hormonema dematioides* a *Ceuthospora pinastri*. Hlavním sekundárním saprotrofem byl bazidiomycet *Mycena galopus*. Při použití obou metod lze rozeznat jarní efekt na společenstvo, které reaguje snížením diverzity. Kolísání diverzity během jednotlivých let je pravděpodobně závislé na mnoha faktorech.

4) Vliv různé délky kůrovcové kalamity na diverzitu hub smrkového opadu se prokázal hlavně metodou T-RFLP. Kultivace odhalila při analýze všech odběrů jen malé rozdíly mezi lokalitami, ale tyto rozdíly byly statisticky průkazné. Zdá se, že lokality déle vystavené změnám podmínek biotopu po kůrovcové kalamitě mají nižší druhovou diverzitu než lokality pozměněné relativně krátce. Tento trend je vidět hlavně na začátku poškození kontrolní lokality, po 3 letech se už společenstva lokalit vyrovnávají.

7 Literatura

- Aoki, T., Tokumasu, S. (1995): Dominance and diversity of the fungal communities on fir needles. *Mycological Research* 99, 1439–1449.
- Avis, P., Dickie, I., Mueller, G. (2006): A ‘dirty’ business: Testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Molecular Ecology* 15, 873–882.
- Allison, S., Hanson, C., Treseder, K. (2007): Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1878-1887.
- Allmér, J. (2005): Fungal communities in branch litter of Norway spruce: dead wood dynamics, species detection and substrate preferences. Disertační práce, *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, 29 p.
- Allmér, J., Vasiliauskas, R., Ihrmark, K., Stenlid, J., Dahlberg, A. (2006): Wood-inhabiting fungal communities in woody debris of Norway spruce (*Picea abies* (L.) karst.), as reflected by sporocarps, mycelial isolations and T-RFLP identification. *FEMS Microbiology Ecology* 55, 57–67.
- Anderson, I., Cairney, J. (2004): Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6, 769-779.
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K., Stenlid, J. (2009): Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* 58, 284-292.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Žifčáková, L., Šnajdr, J., Rídl, J., Vlček, Č., Voříšková, J. (2012): Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 6, 248 – 258.
- Barklund, P., Rowe, J. (1983): Endophytic fungi in Norway spruce – possible use in bioindication of vitality. *Aquilo Series Botanica* 19, 228-232.

- Bennett, L., Kasel, S., Tibbits, J. (2009): Woodland trees modulate soil resources and conserve fungal diversity in fragmented landscapes. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 2162-2169.
- Bills, G., Foster, M. (2004): Formulae for selected materials used to isolate and study fungi and fungal allies. – In: Mueller, G., Bills, G., Foster, M. (eds.), *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*, Elsevier Academic Press, 595-618.
- Boberg, J., Ihrmark, K., Lindahl, B. (2011): Decomposing capacity of fungi commonly detected in *Pinus sylvestris* needle litter. *Fungal Ecology* 4, 110-114.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R., Uroz, S., Martin, F. (2009): 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184, 449-456.
- Bukovská, P., Jelínková, M., Hřelová, H., Sýkorová, Z., Gryndler, M. (2010): Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G + C nukleotide kontent and secondary structure melting point. *Journal of Microbiological Methods* 82, 223 – 228.
- Clement, B., Kehl, L., DeBord, K., Kitts, C. (1998): Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 31, 135-142.
- Dickie, I., FitzJohn, R., (2007): Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 17, 259–270.
- Dighton, J. (2007): Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. – In: Kubicek, C., Druzhinina, I. (eds.) *The mycota IV*, Springer, 287-300.
- Dighton, J., Mason, P. A. (1985): Mycorrhizal dynamics during forest tree development. – In: Moore, D., Casselton, L., Wood, D., Frankland, J. (eds.) *Developmental biology of higher fungi*, Cambridge University Press, 117-139.
- Domsch, K., Gams, W., Anderson, T. (1980): *Compendium of soil fungi I*. Academic Press, 859 p.
- Edwards, I., Turco, R. (2005): Inter- and intraspecific resolution of nrDNA TRFLP assessed by computer-simulated restriction analysis of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 109, 212-226.
- Egert, M., Friedrich, M. (2003): Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism

- analysis of microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2555-2562.
- Ellis, M. (1971): Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Agricultural Bureaux, 602 p.
- Ellis, M. (1976): More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Agricultural Bureaux, 507 p.
- Fassatiová, O. (1986): Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. Elsevier, 223 p.
- Frankland, J. (1998): Fungal succession – unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102, 1-15.
- Gardes, M., Bruns, T. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113-118.
- Grelet, G., Johnson, D., Vrålstad, T., Alexander, I., Anderson, I. (2010): New insights into the mycorrhizal *Rhizoscyphus ericae* aggregate: spatial structure and co-colonization of ectomycorrhizal and ericoid roots. *New Phytologist* 188, 210–222.
- Gryndler M., Bukovská P., Sýkorová Z., Havránková M. (2010): Hodnocení mikrobiální diverzity antropogenních substrátů metodou využívající polymorfismu terminálních restričních fragmentů DNA. *Botanický ústav Akademie věd České republiky*, 22 p.
- Gourbière, F., Gourbière, S., van Maanen, V., Vallet, G., Auger, P. (1999): Proportion of needles colonized by one fungal species in coniferous litter: the dispersal hypothesis. *Mycological Research* 103, 353-359.
- Gourbière, F., van Maanen, A., Debouzie, D. (2001): Associations between three fungi on pine needles and their variation along a climatic gradient. *Mycological Research* 105, 1101–1109.
- Gouy, M., Li, M. (1989): Molecular phylogeny of the kingdoms Animalia, Plantae and Fungi. *Molecular Biology and Evolution* 6, 109-122.
- Hall, T. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P. (2001): PAST – Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9 p.

- Hambleton, S., Sigler, L. (2005): *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* (\equiv *Hymenoscyphus ericae*), Leotiomycetes. *Studies in Mycology* 53, 1-27.
- Hambleton, S., Tsuneda, A., Currah, R. (2003): Comparative morphology and phylogenetic placement of two microsclerotial black fungi from *Sphagnum*. *Mycologia* 95, 959-975.
- Hartmann, M., Enkerli, J., Widmer, F. (2007): Residual polymerase activity-induced bias in terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 9, 555-559.
- Hawksworth, D., Rossman, A., (1997): Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87, 888-891.
- Hayes, A. (1965): Studies on the decomposition of coniferous leaf litter. II. Changes in external features and succession of microfungi. *Journal of Soil Science* 16, 242-257.
- Holec, J. (2000): Mykoflóra Šumavy – základní literární prameny a shrnutí biodiverzity makromycetů v nejvýznamnějších biotopech. *Silva Gabreta* 5, 69-82.
- Chapman, M., Underwood, A. (1999): Ecological patterns in multivariate assemblages: information and interpretation of negative values in ANOSIM tests. *Marine Ecology Progress Series* 180, 257-265.
- Christensen, M., Whittingham, W. (1965): The soil microfungi of open bogs and conifer swamps in Wisconsin. *Mycologia* 57, 882-896.
- Janda, P., Bače, R., Svoboda, M., Starý, M. (2010): Věková a prostorová struktura horského smrkového lesa v I. zóně „Trojmezna“ v NP Šumava. *Silva Gabreta* 16, 43-59.
- Jeewon, R., Hyde, K. (2007): Detection and diversity of fungi from environmental samples: Traditional versus molecular approaches. – In: Varma, J., Oelmüller, R. (eds.) *Advanced techniques in soil microbiology*, Springer, 1-15.
- Jonášová, M. (2001): Regenerace horských smrčín po kůrovcové kalamitě. *Silva Gabreta* 6, 241-248.
- Jonášová, M., Prach, K. (2004): Central-European mountain spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) forests: regeneration of tree species after a bark beetle outbreak. *Ecological Engineering* 23, 15–27.

- Jones, E., Hyde, K. (2002): Succession: where do we go from here? *Fungal Diversity* 10, 241-253.
- Joo, S., Lee, S., Park, S. (2010): Monitoring of phytoplankton community structure using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Journal of Microbiological Methods* 81, 61-68.
- Jumpponen, A., Jones, K. (2009): Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184, 438-448.
- Kindlmann, P., Matějka, K., Doležal, P. (2012): Lesy Šumavy, lýkožrout a ochrana přírody. www.infodatasys.cz/sumava/sumava2012_b.pdf.
- Kinkel, L., Andrews, J. (1988): Disinfestation of living leaves by hydrogen peroxide. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 523–528.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D., Stalpers, J. (eds.), (2008): *Dictionary of the fungi*, CABI, 771 p.
- Kopáček, J., Kaňa, J., Šantrůčková, H., Porcal, P., Hejzlar, J., Píček, T., Veselý, J. (2002): Physical, chemical, and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian forest lakes: I. Plešné Lake. *Silva Gabreta* 8, 43-62.
- Korkama-Rajala, T., Müller, M., Pennanen, T. (2008): Decomposition and fungi of needle litter from slow- and fast-growing Norway spruce (*Picea abies*) clones. *Microbial Ecology* 56, 76-89.
- Koukol, O. (2007): Effect of *Pinus strobus* invasion on the mycoflora of pine litter needles in the Bohemian Switzerland National Park (Czech Republic). – In: Härtel, H., Cílek, V., Herben, T., Jackson, A., Williams, R. (eds.) *Sandstone landscapes*, Academia, 229-233.
- Koukol, O. (2002): Saprotrofní askomycety kolonizující opad borovice lesní a borovice vejmutovky v NP České Švýcarsko. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. 146 p.
- Koukol, O. (2009): Geographical distribution of *Scleroconidioma sphagnicola* in coniferous forests in Europe and Canada. *Czech Mycology* 61, 117-124.
- Koukol, O. (2011): New species of *Chalara* occupying coniferous needles. *Fungal Diversity* 49, 75-91.

- Koukol, O., Beňová, B., Vosmanská, M., Frantík, T., Vosátka, M., Kovářová, M. (2008): Decomposition of spruce litter needles of different quality by *Setulipes androsaceus* and *Thysanophora penicillioides*. *Plant Soil* 311, 151-159.
- 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.
- Koukol, O., Kolařík, M., Kolářová, Z., Baldrian, P. (2012): Diversity of foliar endophytes in wind-fallen *Picea abies* trees. *Fungal Diversity* 54, 69-77.
- Koukol, O., Kolářová, Z. (2010): *Bactrodesmium gabretae* (anamorphic Helotiales), a new sporodochial species described from spruce needles. *Nova Hedwigia* 91, 243–248.
- Koukol, O., Kovářová, M. (2007): Autecology of *Scleroconidioma sphagnicola* particularly in Šumava National Park (Czech Republic). *Czech Mycology* 59, 111-123.
- Koukol, O., Mrnka, L., Kulhánková, A., Vosátka, M. (2006): Competition of *Scleroconidioma sphagnicola* with fungi decomposing spruce litter needles. *Canadian Journal of Botany* 84, 469-476.
- Koukol, O., Novák, F., Hrabal, R., Vosátka, M. (2006): Saprotrophic fungi transform organic phosphorus from spruce needle litter. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3372-3379.
- Kovářová, M., Vacek, S. (2003): Mountain Norway spruce forests: Needle supply and its nutrient content. *Journal of Forest Science* 49, 327-332.
- Kubartová, A., Ranger, J., Berthelin, J., Beguiristain, T. (2009): Diversity and decomposing ability of saprophytic fungi from temperate forest litter. *Microbial Ecology* 58, 98-107.
- Kubátová, A., Váňová, M., Prášil, K. (1998): Contribution to the biodiversity of soil microfungi of the Šumava Mts., Czech Republic. *Silva Gabreta* 2, 23-34.
- Kučera, T. (2010): Smrčiny. – In: Chytrý, M., Kučera, T., Kočí, M., Grulich, V., Lustyk, P. (eds.) *Katalog biotopů České republiky*, Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, 340-349.
- Lee, S., Lee, H., Kim, S., Lee, H., Kang, H., Kim, Y. (2010): Identification of airborne bacterial and fungal community structures in an urban area by T-RFLP analysis and quantitative real-time PCR. *Science of the Total Environment* 408, 1349-1357.

- Lehtijärvi, A., Barklund, P. (1999): Effects of irrigation, fertilization and drought on the occurrence of *Lophodermium piceae* in *Picea abies* needles. *Scandinavian Journal of Forest Research* 14, 121-126.
- Lekberg, Y., Schnoor, T., Kjølner, R., Gibbons, S., Hansen, L., Al-Soud, W., Sørensen, S., Rosendahl, S. (2012): 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* in press, doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01894.x.
- Leslie, J., Summerell, B. (2006): Media – recipes and preparation. – In: Leslie, J., Summerell, B. (eds.), *The Fusarium laboratory manual*, Blackwell Publishing, 5-14.
- Lindahl, B., Boberg, J. (2008): Distribution and function of litter Basidiomycetes in coniferous forests. – In: Boddy, L., Frankland, J., van West, P. (eds.) *Ecology of saprotrophic Basidiomycetes*, Academic Press, 183-196.
- Lindahl, B., Taylor, A., Finlay, R. (2002): Defining nutritional constraints on carbon cycling in boreal forests – towards a less ‘phytogenic’ perspective. *Plant and Soil* 242, 123-135.
- Lindner, D., Vasaitis, R., Kubartová, A., Allmér, J., Johannesson, H., Banik, M., Stenlid, J. (2011): Initial fungal colonizer affects mass loss and fungal community development in *Picea abies* logs 6 yr after inoculation. *Fungal Ecology* 4, 449-460.
- Livsey, S., Barklund, P. (1992): *Lophodermium piceae* and *Rhizosphaera kalkhoffii* in fallen needles of Norway spruce (*Picea abies*). *European Journal of Forest Pathology* 22, 204-216.
- Lorenzi, E., Lorando, E., Picco, A. (2006): Microfunghi endofitici ed epifitici di *Picea abies* (L.) Karst. in ambiente natural ed antropizzato in Lombardia. *Forest@* 3, 426–436.
- Lustyk, P. (2009): Acidofilní smrčiny (*Vaccinio-Piceetea*). – In: Härtel, H., Lončáková, J., Hošek, M. (eds.), *Mapování biotopů v České republice. Východiska, výsledky, perspektivy*, Agentura ochrany přírody České republiky, 59.
- Mitchell, C., Millar, C. (1978): Mycofloral succession on Corsican pine needles colonized on the tree by three different fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 71, 303–317.

- Miyamoto, T., Igarashi, T., Takahashi, K. (2000): Lignin-degrading ability of litter-decomposing basidiomycetes from *Picea* forests of Hokkaido. *Mycoscience* 41, 105-110.
- Morrall, R., Vanterpool, T. (1968): The soil microfungi of upland boreal forest at Candle Lake, Saskatchewan. *Mycologia* 60, 642-654.
- Mueller, M., Bills, G., Foster, M. (eds.), (2004): Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Academic Press, 777 p.
- Müller, M., Hallaksela, A. (1998): Diversity of Norway spruce needle endophytes in various mixed and pure Norway spruce stands. *Mycological Research* 102, 1183-1189.
- Müller, M., Hallaksela, A. (2000): Fungal diversity in Norway spruce: a case study. *Mycological Research* 104, 1139-1145.
- Müller, M., Valjakka, R., Suokko, A., Hantula, J. (2001): Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology* 10, 1801-1810.
- Nag Raj, T. (1993): Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications, 1101 p.
- Neuhäuslová, Z. (ed.), (2001): Mapa potenciální přirozené vegetace České republiky. Academia, 341 p.
- Nilsson, L., Bååth, E., Falkengren-Grerup, U., Wallander, H. (2007): Growth of ectomycorrhizal mycelia and composition of soil microbial communities in oak forest soils along a nitrogen deposition gradient. *Oecologia* 153, 375–384.
- Nilsson, R., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. (2009): The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters* 296, 97–101.
- Nilsson, R., Abarenkov, K., Veldre, V., Nylinder, S., deWit, P., Brosché, S., Alfredsson, J., Ryberg, M., Kristiansson, E. (2010): An open source chimera checker for the fungal ITS region. *Molecular Ecology Resources* 10, 1076–1081.
- Nilsson, R., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K. (2008): Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4, 193–201.

- Nováková, A., Blažková, P. (2000): Mikroskopické houby v půdách vybraných horských smrčín České republiky, *Silva Gabreta* 5, 63-68.
- O'Brien, H., Parrent, J., Jackson, J., Moncalvo, J., Vilgalys, R. (2005): Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5544-5550.
- O'Donnell, K. (1993): *Fusarium* and its relatives. – In: Reynolds, D., Taylor, J. (eds.), *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*, CAB International, 225–233.
- Ohtaka, N., Narisawa, K. (2008): Molecular characterization and endophytic nature of the root-associated fungus *Meliniomyces variabilis* (LtVB3). *Journal of General Plant Pathology* 74, 24–31.
- Öpik, M., Metsis, M., Daniell, T., Zobel, M., Moora, M. (2009): Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184, 424-437.
- Osono, T. (2006): Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 701-716.
- Osono, T., Takeda, H. (2006): Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia* 98, 172-179.
- Persson, Y., Vasaitis, R., Långström, B., Öhrn, P., Ihrmark, K., Stenlid, J. (2009): Fungi vectored by the bark beetle *Ips typographus* following hibernation under the bark of standing trees and in the litter. *Microbial Ecology* 58, 651–659.
- Peršoh, D., Segert, J., Zigan, A., Rambold, G. (2012): Fungal community composition shift along a leaf degradation gradient in a European beech forest. *Plant Soil* in press, doi: 10.1007/s11104-012-1271-y.
- Pilát, A. (1968): *Boletus gabretae* sp. nov. bohémica ex affinate *Boleti junquillei* (Quél.). *Boud. Česká Mykologie* 22, 167-170.
- Ponge, J. (1991): Succession of fungi and fauna during decomposition of needles in a small area of Scots pine litter. *Plant Soil* 138, 99–131.
- 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. *Microbial Ecology* 56, 332–340.

- Prášil, K., Réblová, M. (1998): Biodiversity of selected Ascomycetes groups in the Šumava Mountains. *Silva Gabreta* 2, 7-22.
- Purahong, W., Krüger, D. (2012): A better understanding of functional role of fungi in the decomposition process: using precursor rRNA containing ITS regions as a marker for the active fungal community. *Annals of Forest Science* in press, doi: 10.1007/s13595-012-0210-7.
- Rabinovich, M., Melnik, M., Bolobova, A. (2002): Microbial cellulases (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 38, 355-373.
- R Development Core Team (2011): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- Reddy, T., Knowles, R. (1965): The fungal flora of a boreal forest raw humus. *Canadian Journal of Microbiology* 11, 837-843.
- Rosling, A., Cox, F., Cruz-Martinez, K., Ihrmark, K., Grelet, G., Lindahl, B., Menkis, A., James, T. (2011): "Archaeorhizomycetes: Unearthing an ancient class of ubiquitous soil fungi". *Science* 333, 876–879.
- Rumberger, A., Merwin, I., Thies, J. (2007): Microbial community development in the rhizosphere of apple trees at a replant disease site. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1645-1654.
- Sagová-Marečková, M., Čermák, L., Novotná, J., Plháčková, K., Forstová, J., Kopecký, J. (2008): Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2902-2907.
- Scattolin, L., Montecchio, L. (2009): *Lophodermium piceae* and *Rhizosphaera kalkhoffii* in Norway spruce: correlations with host age and climatic features. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 226-239.
- Shendure, J., Ji, H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26, 1135-1145.
- Schalin, I. (1967): Microfungi in the humus layer of pine, spruce, and birch stands in southern Finland. *Silva Fennica* 2, 35-48.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005): The endophytic continuum. *Mycological Research* 109, 661-686.
- Schütte, U., Abdo, Z., Bent, S., Shyu, C., Williams, C., Pierson, J., Forney, L. (2008): Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

- analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 365-380.
- Schmit, J., Mueller, G. (2007): An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* 16, 99–111.
- Sieber, T. (1989): Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research* 92, 322-326.
- Söderström, B. (1975): Vertical distribution of microfungi in a spruce forest soil in the south of Sweden. *Transactions of the British Mycological Society* 65, 419-425.
- Söderström, B., Bååth, E. (1978): Soil microfungi in three Swedish coniferous forests. *Holarctic Ecology* 1, 62-72.
- Sokolski, S., Bernier-Cardou, M., Bérubé, J. (2007): Black spruce (*Picea mariana*) foliage hosts numerous and potentially endemic fungal endophytes. *Canadian Journal of Forest Research* 37, 1737–1747.
- Solheim, H. (1989): Fungi on spruce needles in Norway. *European Journal of Forest Pathology* 19, 189-191.
- Stefani, F., Bérubé, J. (2006): Biodiversity of foliar fungal endophytes in white spruce (*Picea glauca*) from southern Québec. *Canadian Journal of Botany* 84, 777-790.
- Sutton, B. (1980): *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*, Commonwealth Mycological Institute, 696 p.
- Svoboda, M. (2007): Les ve druhé zóně v oblasti Trojmezí není hospodářskou smrčinou: změni se management dřívě, než vznikne rozsáhlá asanovaná plocha? *Silva Gabreta* 13, 171-187.
- Šálek, M., Růžička, J., Mandák, B. (2005): *Ekologie*. Fakulta lesnická a environmentální České zemědělské univerzity v Praze a Lesnická práce, 121 p.
- Talgø, V., Chastagner, G., Thomsen, I., Cech, T., Riley, K., Lange, K., Klemsdal, S., Stensvand, A. (2010): *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.). *Fungal Biology* 114, 545-554.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

- Tedersoo, L., Nilsson, R., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G., Kõljalg, U. (2010): 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist* 188, 291-301.
- Tokumasu, S. (1998): Fungal successions on pine needles fallen at different seasons: the succession of surface colonizers. *Mycoscience* 39, 419-423.
- Torsvik, V., Øvreås, L. (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5, 240-245.
- Tsuneda, A., Thormann, M., Currah, R. (2000): *Scleroconidioma*, a new genus of dematiaceous hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany* 78, 1294-1298.
- Unterseher, M., Reiher, A., Finstermeier, K., Otto, P., Morawetz, W. (2007): Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress* 6, 201-212.
- Unterseher, M., Tal, O. (2006): Influence of small scale conditions on the diversity of wood decay fungi in a temperate, mixed deciduous forest canopy. *Mycological Research* 110, 169-178.
- Vacek, S. (ed.), (2003): *Horské lesy České republiky*. Ministerstvo zemědělství České republiky, 319 p.
- Váňa, J. (1996): Historie a současný stav výzkumu bezcévných rostlin Šumavy. *Silva Gabreta* 1, 37-49.
- van Maanen, A., Gourbière, F. (1997): Host and geographical distribution of *Verticicladium trifidum*, *Thysanophora penicillioides*, and similar fungi on decaying coniferous needles. *Canadian Journal of Botany* 75, 699-710.
- Vasiliauskas, R., Lygis, V., Larsson, K., Stenlid, J. (2005): Airborne fungal colonisation of coarse woody debris in north temperate *Picea abies* forest: impact of season and local spatial scale. *Mycological Research* 109, 487-496.
- Vasiliauskas, R., Stenlid, J. (1998): Fungi inhabiting stems of *Picea abies* in a managed stand in Lithuania. *Forest Ecology and Management* 109, 119-126.
- Wang, G., Wang, Y. (1997): Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4645-4650.

- Widden, P., Parkinson, D. (1973): Fungi from Canadian coniferous forest soils. *Canadian Journal of Botany* 51, 2275-2290.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. - In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. (eds.), *PCR protocols, a guide to methods and applications*, Academic Press, 315-322.
- Widden, P., Scattolin, V. (1988): Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80, 795-803.
- Žifčáková, L., Dobiášová, L., Kolářová, Z., Koukol, O., Baldrian, P. (2011): Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles. *Fungal Ecology* 4, 427-436.

Internetové zdroje aktuální k 24.8.2012:

www.mapy.cz

www.isth.info

www.ebi.ac.uk

www.indexfungorum.org

www.mycobank.org

www.nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

8 Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Přehled kmenů izolovaných z jehlic *Picea abies* v opadových sáčcích a jejich finální určení do druhu nebo vyšší taxonomické jednotky na základě nejbližší podobné sekvence (ITS nebo LSU rDNA) v databázi GenBank (u rodu *Trichoderma* s databází TrichOKEY).

Příloha 2: Fylogenetický strom sekvencí ITS rDNA izolovaných kmenů z oddělení Basidiomycota.

Příloha 3: Fylogenetický strom sekvencí ITS rDNA izolovaných kmenů z oddělení Ascomycota.

Příloha 4: Tabulka průměrných četností izolovaných taxonů na kůrovcových (B) a kontrolních (C) lokalitách podle délky umístění opadových sáčků v terénu (0, 1, 8, 13, 20, 25, 37 měsíců).

Příloha 5: Tabulka průměrných četností získaných fragmentů (v ‰) metodou T-RFLP na kůrovcových (B) a kontrolních (C) lokalitách podle délky umístění opadových sáčků v terénu (0, 1, 8, 13, 20, 25, 37 měsíců).

Příloha 6: Grafy přítomnosti fragmentů T-RFLP na kůrovcových (červená) a kontrolních lokalitách (modrá) v jednotlivých měsících odběru

Příloha 1: Přehled kmenů izolovaných z jehlic *Picea abies* v opadových sáčcích a jejich finální určení do druhu nebo vyšší taxonomické jednotky na základě nejbližší podobné sekvence (ITS nebo LSU rDNA) v databázi GenBank (u rodu *Trichoderma* s databází TrichOKEY) a fenotypických znaků. Není-li uvedeno jinak, značí „-“ nesekvenované kmeny z důvodu nadbytečnosti; acc. number = přístupový kód sekvence z GenBanku.

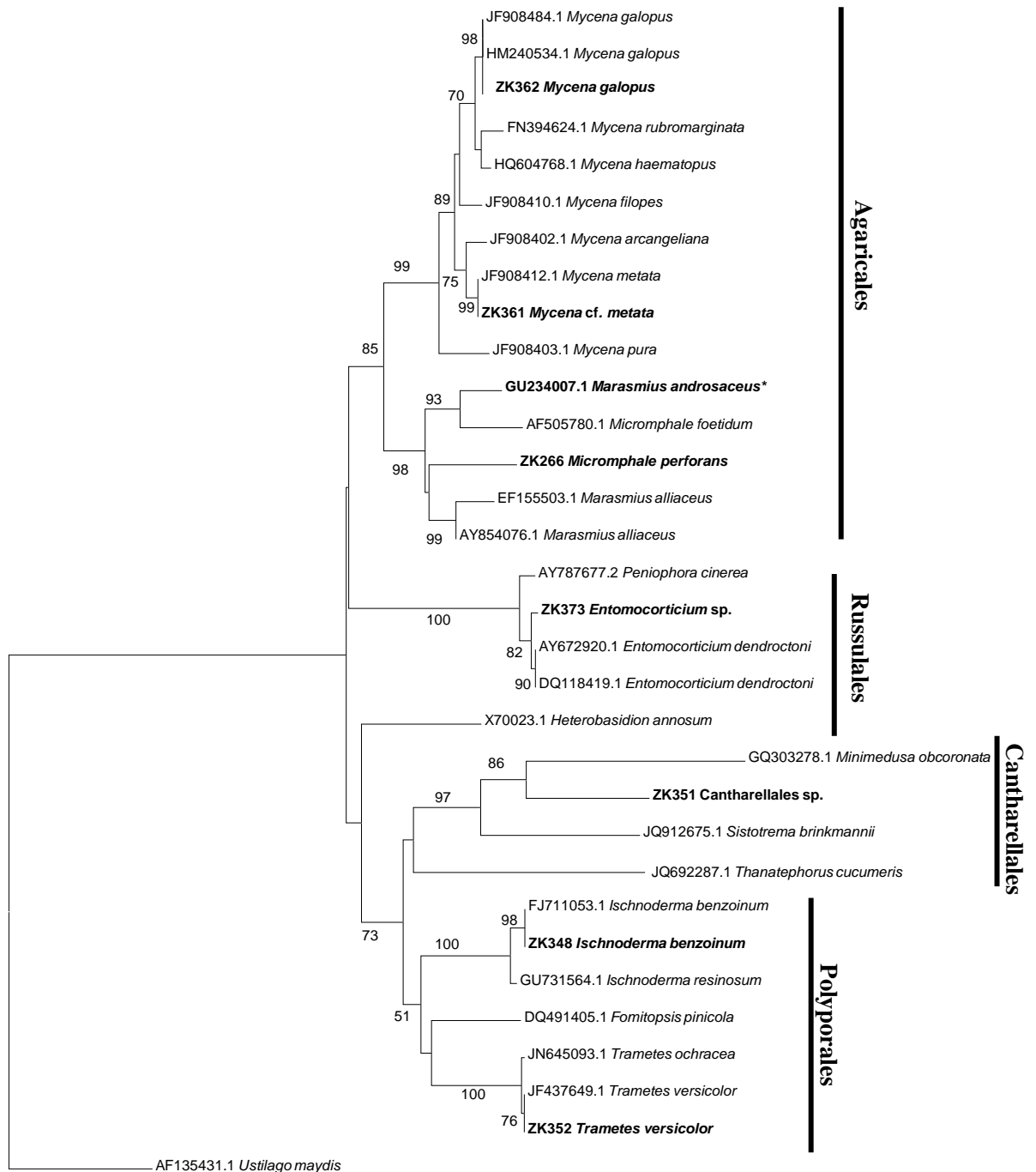
Oddělení Zygomycota								
		ITS rDNA			LSU rDNA			
kmen	taxon	acc. number	taxon	%	acc. number	taxon	%	fenotyp
ZK199	<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	AY243950.1	<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>	99%	AJ876782.1	<i>Mucor hiemalis</i>	99%	<i>Mucor hiemalis f. corticola</i>
ZK233	<i>Mucor zonatus</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Mucor zonatus</i>
ZK309	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	EU715662.1	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	94%	-	-	-	<i>Umbelopsis ramanniana</i>
ZK350	<i>Mortierella sp.</i>	HQ211549.1	<i>Uncultured Mortierella</i>	97%	-	-	-	<i>Mortierella sp.</i>
Oddělení Basidiomycota								
		ITS rDNA			LSU rDNA			
kmen	taxon	acc. number	taxon	%	acc. number	taxon	%	fenotyp
ZK239	<i>Mycena galopus</i>	-	nečitelná sekvence	-	HM240534.1	<i>Mycena galopus</i>	100%	bazidiomycet
ZK260	<i>Mycena sp.</i>	-	nečitelná sekvence	-	HM240534.1	<i>Mycena galopus</i>	98%	bazidiomycet
ZK266	<i>Micromphale perforans</i>	AJ406586.1	<i>Micromphale perforans</i>	99%	AJ406586.1	<i>Micromphale perforans</i>	99%	Marasmius
ZK276	<i>Marasmius androsaceus</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Marasmius androsaceus</i>
ZK310	<i>Minimedusa sp.</i>	-	nečitelná sekvence	-	DQ915476.1	<i>Minimedusa polyspora</i>	97%	bazidiomycet
ZK348	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	FJ711053.1	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	100%	-	-	-	bazidiomycet
ZK351	Cantharellales sp.	HQ433223.1	<i>Uncultured Basidiomycota</i>	92%	HQ433160.1	<i>Uncultured Basidiomycota</i>	95%	sterilní narůžovělé mycelium
ZK352	<i>Trametes versicolor</i>	GU731582.1	<i>Trametes versicolor</i>	97%	-	-	-	bazidiomycet
ZK361	<i>Mycena metata</i>	JF908412.1	<i>Mycena metata</i>	100%	-	-	-	bazidiomycet
ZK373	<i>Entomocorticium sp.</i>	FR837930.1	<i>Entomocorticium sp.</i>	99%	-	-	-	sterilní světlé mycelium
Oddělení Ascomycota								
		ITS rDNA			LSU rDNA			
kmen	taxon	acc. number	taxon	%	acc. number	taxon	%	fenotyp
-	<i>Cladosporium herbarum</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Cladosporium herbarum</i>

Oddělení Ascomycota								
kmen	taxon	ITS rDNA			LSU rDNA			fenotyp
		acc. number	taxon	%	acc. number	taxon	%	
-	<i>Cladosporium cladosporoides</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
ZK148	<i>Cistella acuum</i>	FR667211	<i>Cistella acuum</i>	100%	-	-	-	<i>Cistella acuum</i>
ZK155	<i>Chalara holubovae</i>	EU040232.1	<i>Hyalodendriella betulae</i>	97%	-	-	-	<i>Chalara holubovae</i>
ZK151	<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	AJ608955.1	<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	100%	-	-	-	<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>
ZK190	<i>Thysanophora penicillioides</i>	AF454086.1	<i>Thysanophora penicillioides</i>	99%	AF454086.1	<i>Thysanophora penicillioides</i>	100%	<i>Thysanophora penicillioides</i>
ZK191	<i>Scleroconidioma sphagnicola</i>	AY805592.1	<i>Scleroconidioma sphagnicola</i>	100%	HM122967.1	<i>Fungal sp.</i>	100%	<i>Scleroconidioma sphagnicola</i>
ZK193	<i>Phacidiopycnis sp. 1</i>	FR715996.1	<i>Phacidiopycnis sp.</i>	100%	FR715996.1	<i>Phacidiopycnis sp.</i>	99%	<i>Phacidiopycnis sp. 1</i>
ZK194	<i>Hormonema dematioides</i>	GQ153122.1	<i>Dothideomycetes sp.</i>	99%	DQ678058	<i>Sydowia polyspora</i>	99%	<i>Hormonema dematioides</i>
ZK195	<i>Trichoderma pleuroticola</i>	EU280071.1	<i>Trichoderma pleuroticola</i>	99%	JF449619.1	<i>Uncultured Trichoderma clone</i>	99%	<i>Trichoderma pleuroticola</i>
ZK196	<i>Fusarium flocciferum</i>	-	krátká sekvence	-	GQ505465.1	<i>Fusarium flocciferum</i>	99%	<i>Fusarium flocciferum</i>
ZK197	<i>Epicoccum nigrum</i>	AF455403.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	FM991735.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	99%	<i>Epicoccum nigrum</i>
ZK198	<i>Trichoderma viride</i>	FJ481123.1	<i>Trichoderma viride</i>	100%	-	kontaminace	-	<i>Trichoderma viride</i>
ZK201	<i>Chalara longipes</i>	FR667214.1	<i>Chalara longipes</i>	99%	-	-	-	<i>Chalara longipes</i>
ZK204	<i>Chalara piceae-abietis</i>	FR667230.1	<i>Chalara piceae-abietis</i>	100%	FR667878.1	<i>Chalara piceae-abietis</i>	99%	<i>Chalara piceae-abietis</i>
ZK205	<i>Ceuthospora pinastri</i>	AB511811.1	<i>Leotiomyces sp.</i>	99%	EU046054.1	<i>uncultured Pezizomycotina</i>	94%	<i>Ceuthospora pinastri</i>
ZK206	<i>Cytospora sp. 1</i>	FJ903284.1	<i>Cytospora sp.</i>	99%	AF408387.1	<i>Cytospora niveum</i>	97%	<i>Cytospora sp. 1</i>
ZK208	<i>Trichoderma polysporum</i>	AM498498.1	<i>Hypocrea pachybasioides</i>	100%	AY283550.1	<i>Trichoderma sp.</i>	99%	<i>Trichoderma polysporum</i>
ZK211	<i>Varicosporium elodeae</i>	JF519227.1	<i>Uncultured Gyoerffyella</i>	99%	GQ152148.1	<i>Varicosporium elodeae</i>	100%	<i>Varicosporium elodeae</i>
ZK212	<i>Phacidiopycnis sp. 2</i>	EU754125.1	<i>Allantophoma endogenospora</i>	100%	FR715996.1	<i>Phacidiopycnis sp.</i>	-	<i>Phacidiopycnis sp. 2</i>
ZK217	<i>Botrytis cinerea</i>	HM849615.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	100%	AY544651.1	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	100%	<i>Botrytis cinerea</i>
ZK218	<i>Cistella sp.</i>	FR667211.1	<i>Cistella acuum</i>	98%	FR667860.1	<i>Cistella acuum</i>	99%	<i>Cistella sp.</i>
ZK234	<i>Herpotrichia juniperi</i>	FJ904485.1	<i>Herpotrichia juniperi</i>	99%	-	nečitelná sekvence	-	sterilní černý hyfomycet
ZK236	<i>Fusicladium sp.</i>	GU446639.1	<i>Fusicladium sp.</i>	99%	AY352588.1	<i>Cladosporium nigrellum</i>	99%	<i>Fusicladium sp. 1</i>
ZK237	<i>Trichoderma koningii</i>	AJ301990.1	<i>Hypocrea koningii</i>	99%	-	nečitelná sekvence	-	<i>Trichoderma sp.</i>
ZK249	<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	-	kontaminace DNA	-	-	-	-	<i>Rhinocladiella atrovirens</i>
ZK263b	<i>Chaetomium funicola</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Chaetomium funicola</i>

Oddělení Ascomycota								
kmen	taxon	ITS rDNA			LSU rDNA			fenotyp
		acc. number	taxon	%	acc. number	taxon	%	
ZK267	<i>Chalara hyalocuspica</i>	EF093148.1	<i>Helotiales sp.</i>	100%	-	nečitelná sekvence	-	<i>Chalara hyalocuspica</i>
ZK282	<i>Clasterosporium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Clasterosporium sp.</i>
ZK284	<i>Penicillium spinulosum</i>	FJ430767.1	<i>Penicillium spinulosum</i>	100%	-	-	-	<i>Penicillium spinulosum</i>
ZK285	<i>Phialocephala fortinii</i>	AY394921.1	<i>Phialocephala fortinii</i>	99%	-	-	-	<i>Phialocephala fortinii</i>
ZK288	<i>Fusarium avenaceum</i>	FJ614645.1	<i>Gibberella avenacea</i>	100%	-	-	-	<i>Fusarium avenaceum</i>
ZK290	<i>Chalara cf. affinis</i>	FR846484.1	<i>Helotiales sp.</i>	96%	HQ433125.1	Uncultured Ascomycota clone	99%	<i>Chalara cf. affinis</i>
ZK294	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-	-	-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
ZK297	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	AY805566.1	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	100%	-	-	-	<i>Lecythophora hoffmannii</i>
ZK298	<i>Trichoderma atroviride</i>	HQ115671.1	<i>Trichoderma atroviride</i>	100%	-	-	-	<i>Trichoderma atroviride</i>
ZK299	<i>Rhinocladiella sp.</i>	-	kontaminace DNA	-	-	-	-	<i>Rhinocladiella sp.</i>
ZK307	<i>Dothideomycetes sp.</i>	JQ760055.1	<i>Dothideomycetes sp.</i>	90%	-	-	-	sterilní tmavě hnědý hyfomycet
ZK313	<i>Penicillium canescens</i>	AF034463.1	<i>Penicillium canescens</i>	100%	-	-	-	<i>Penicillium canescens</i>
ZK316	Helotiales sp. 1	FN669230.1	<i>Meliniomyces sp.</i>	96%	-	-	-	sterilní šedivý hyfomycet
ZK317	<i>Trichoderma sp.</i>	DQ083020.1	<i>Trichoderma oblongisporum</i>	99%	-	-	-	<i>Trichoderma sp.</i>
ZK321	<i>Leotiomyces sp.</i>	FR846483	<i>Leotiomyces sp.</i>	97%	HM044552.1	Uncultured Helotiales	98%	sterilní hnědý hyfomycet
ZK326	<i>Rhytismataceae sp.</i>	FR837916.1	<i>Rhytismataceae sp.</i>	99%	-	-	-	sterilní růžovo-bílý askomycet
ZK334	<i>Lophodermium piceae</i>	FR837918.1	<i>Lophodermium piceae</i>	99%	-	-	-	sterilní askomycet
ZK341	<i>Sordariomyces sp.</i>	JQ759832.1	<i>Sordariomyces sp.</i>	100%	-	-	-	bílý hyfomycet s oranžovým pigmentem
ZK343	<i>Lachnum sp.</i>	HQ211775.1	Uncultured <i>Lachnum</i> clone	98%	-	-	-	sterilní bílo-žluté mycelium
ZK344	Helotiales sp. 2	JF449506.1	Uncultured <i>Helotiales</i>	99%	-	-	-	asi hyfomycet
ZK346	<i>Varicosporium sp.</i>	GQ477346.1	<i>Varicosporium trimosum</i>	100%	-	-	-	sterilní bílošedý hyfomycet
ZK349	<i>Phialocephala sp.</i>	EU434823.1	<i>Acephala sp.</i>	97%	AY394921.1	<i>Phialocephala fortinii</i>	99%	<i>Phialocephala sp.</i>
ZK363	<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	EF641880.1	<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	100%	-	-	-	<i>Verticillium sp.</i>
ZK365	<i>Geniculosporium sp.</i>	-	kontaminace DNA	-	-	-	-	<i>Geniculosporium sp.</i>
ZK366	<i>Herpotrichia sp.</i>	FJ904498.1	<i>Herpotrichia sp.</i>	99%	FJ904498.1	<i>Herpotrichia sp.</i>	99%	sterilní tmavý hyfomycet

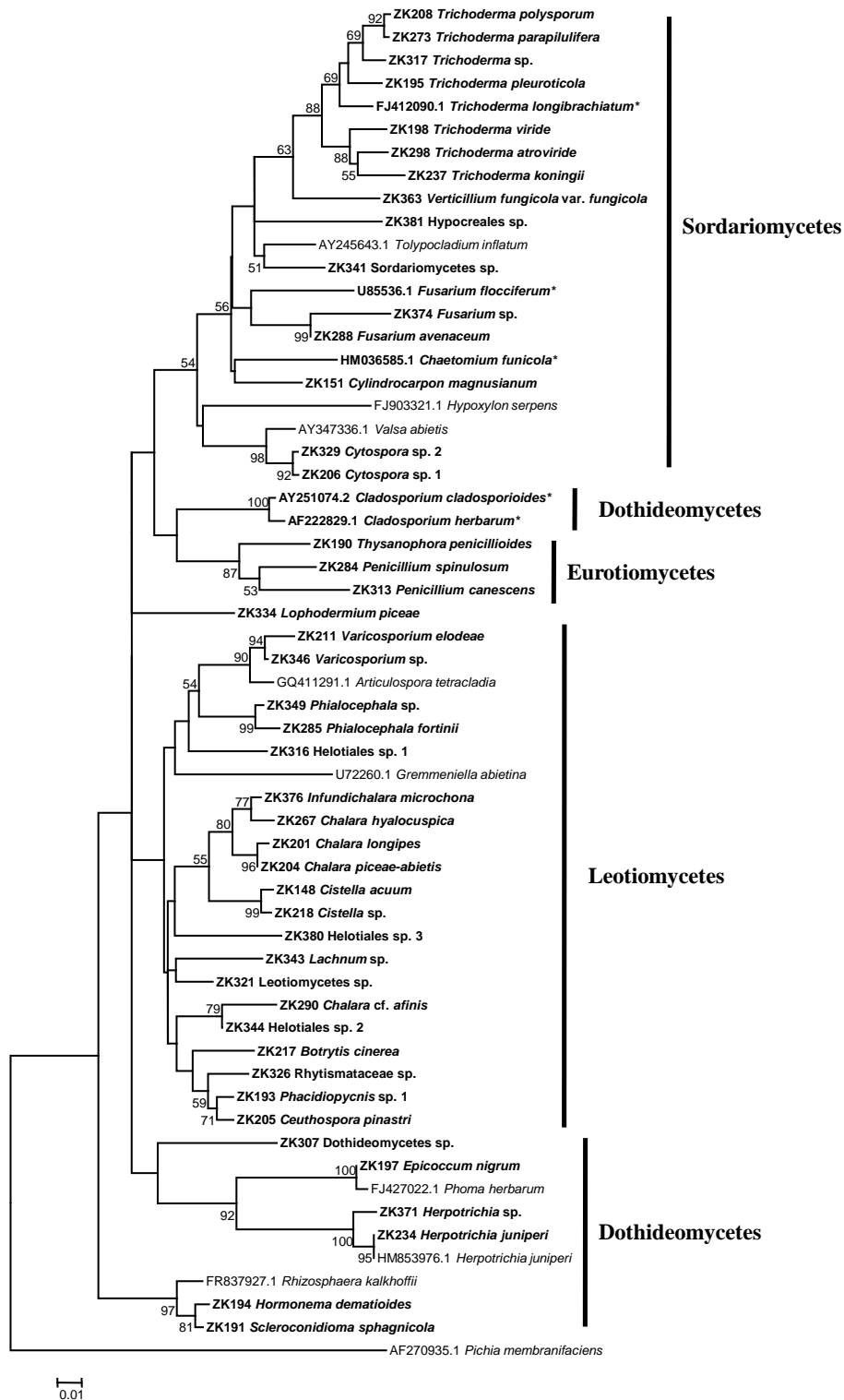
Oddělení Ascomycota								
		ITS rDNA			LSU rDNA			
kmen	taxon	acc. number	taxon	%	acc. number	taxon	%	fenotyp
ZK374	<i>Fusarium sp.</i>	GU480951.1	<i>Fusarium sp.</i>	93%	JF340258.1	<i>Gibberella avenacea</i>	99%	sterilní bílý hyfomycet
ZK376	<i>Infundichalara microchona</i>	FR667221.1	<i>Chalara sp.</i>	98%	FR667221.1	<i>Chalara sp.</i>	97%	sterilní hnědošedý hyfomycet
ZK380	Helotiales sp. 3	JF449673.1	Uncultured Leotiomyces	96%	-	-	-	sterilní hnědošedý hyfomycet
ZK381	Hypocreales sp.	AB027368.1	<i>Elaphocordyceps inegoensis</i>	97%	-	-	-	<i>Acremonium sp.</i>

Příloha 2: Phylogenetický strom sekvencí ITS rDNA izolovaných kmenů z oddělení Basidiomycota, vytvořený metodou Neighbor-joining. Strom je doplněn sekvencemi z GenBanku, vlastní kmeny jsou zvýrazněny tučně. Některé kmeny byly z analýzy vyloučeny.



* Z kmene ZK267 *Marasmius androsaceus* nebyla izolována DNA, na místo ní je vložena sekvence z Genbanku.

Příloha 3: Phylogenetický strom sekvencí ITS rDNA izolovaných kmenů z oddělení Ascomycota, vytvořený metodou Neighbor-joining. Strom je doplněn sekvencemi z GenBanku, vlastní kmeny jsou zvýrazněny tučně. Z kmenů s * nebyla izolována DNA, na místo ní je vložena sekvence z Genbanku. Některé kmeny byly z analýzy vyloučeny.



Příloha 4: Tabulka průměrných četností izolovaných taxonů na kůrovcových (B) a kontrolních (C) lokalitách podle délky umístění opadových sáčků v terénu (0, 1, 8, 13, 20, 25, 37 měsíců). Tabulka obsahuje dále četnosti sterilních jehlic a celkový počet taxonů na kůrovcových a kontrolních lokalitách. Šedivě je vyznačeno pět nejčtenějších taxonů pro danou lokalitu a čas.

	iniciální vzorky	1. měsíc		8. měsíc		13. měsíc		20. měsíc		25. měsíc		37. měsíc		
		lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	
sterilní jehlice		6,0%	2,01%	0,06%	4,33%	10,00%	17,67%	24,67%	51,67%	46,33%	73,33%	74,33%	82,33%	83,00%
zygomycety	izolované taxony													
	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	1,00%	2,67%	2,00%	0,33%	0,00%	1,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	<i>Mortierella</i> sp.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
	<i>Mucor zonatus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
bazidiomycety	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%
	<i>Cantharellales</i> sp.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
	<i>Entomocorticium</i> sp.	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%
	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
	<i>Marasmius androsaceus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	1,67%	0,67%	0,33%	2,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%
	<i>Micromphale perforans</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	<i>Minimedusa</i> sp.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
	<i>Mycena galopus</i>	0,00%	0,00%	0,00%	2,67%	3,33%	9,67%	10,67%	6,67%	9,00%	4,67%	4,00%	4,33%	2,33%
	<i>Mycena metata</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%
	<i>Mycena</i> sp.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	9,00%	10,00%	0,00%	0,00%	1,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	<i>Trametes versicolor</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
	askomycety	<i>Botrytis cinerea</i>	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Ceuthospora pinastri</i>		5,00%	11,33%	9,67%	18,67%	11,67%	3,67%	1,00%	0,00%	1,67%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
<i>Cistella acuum</i>		0,00%	0,33%	1,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cistella</i> sp.		0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cladosporium cladosporoides</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cladosporium herbarum</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Clasterosporium</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cylindrocarpon magnusianum</i>		0,00%	0,67%	0,00%	3,67%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Cytospora</i> sp. 1		1,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Dothideomyces</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Epicoecium nigrum</i>		0,00%	0,33%	0,33%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Fusarium avenaceum</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Fusarium flocciferum</i>		0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Fusarium</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%
<i>Fusicladium</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	4,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Geniculosporium</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%
<i>Helotiales</i> sp. 1		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	3,00%	0,00%	0,33%
<i>Helotiales</i> sp. 2		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
<i>Helotiales</i> sp. 3		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%
<i>Herpotrichia juniperi</i>		0,00%	0,00%	0,00%	1,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,33%	0,67%	0,00%	0,00%
<i>Herpotrichia</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,33%	1,67%	1,33%
<i>Hormonema dematioides</i>		12,00%	2,67%	8,33%	1,67%	6,00%	0,33%	0,00%	0,33%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Hypocreales</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	5,33%	6,00%
<i>Chaetomium funicola</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chalara</i> cf. <i>affinis</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,33%	0,33%	0,00%	1,00%	0,00%
<i>Chalara holubovae</i>		0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chalara hyalospica</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	1,67%	0,00%	0,00%	0,33%	3,33%	0,67%	1,33%
<i>Chalara longipes</i>		5,00%	9,33%	13,67%	0,67%	0,00%	2,33%	5,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Chalara piceae-abetis</i>		2,00%	8,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Infundichalara microchona</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%
<i>Lachnum</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
<i>Lecythophora hoffmannii</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,33%	0,33%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%
<i>Leotiomyces</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
<i>Lophodermium piceae</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Penicillium canescens</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,67%	0,00%	0,00%
<i>Penicillium spinulosum</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Phacidiopycnis</i> sp. 1		1,00%	0,67%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Phacidiopycnis</i> sp. 2		0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Phialocephala fortinii</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Phialocephala</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	1,67%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Rhinocladiella</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,33%	1,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Rhytismataceae</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
<i>Scleroconidioma sphagnicola</i>		78,00%	84,33%	80,00%	72,00%	67,67%	38,33%	40,00%	33,00%	32,67%	12,00%	12,00%	4,67%	4,00%
<i>Sordariomyces</i> sp.		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%
<i>Thysanophora penicillioides</i>		28,00%	51,00%	48,00%	31,33%	25,00%	2,00%	5,67%	0,33%	4,33%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Trichoderma atroviride</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Trichoderma koningii</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,33%
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	13,33%	14,00%	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Trichoderma paraplulifera</i>		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,67%	0,33%	1,00%	1,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%
<i>Trichoderma pleuroticola</i>		4,00%	2,00%	4,33%	1,00%	1,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Trichoderma polysporum</i>		0,00%	1,00%	0,00%	2,00%	0,33%	39,67%	22,67%	11,67%	5,33%	7,67%	0,00%	4,67%	1,67%
<i>Trichoderma</i> sp.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	1,33%	0,00%	0,00%	
<i>Trichoderma viride</i>	1,00%	2,00%	0,00%	1,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,67%	0,67%	0,67%	0,00%	0,00%	
<i>Varicosporium elodeae</i>	0,00%	0,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
<i>Varicosporium</i> sp.	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	0,00%	
<i>Verticillium fungicola</i> var. <i>fungicola</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	
počet taxonů	11	18	13	20	12	16	16	13	15	14	22	11	13	

Příloha 5: Tabulka průměrných četností získaných fragmentů (v ‰) metodou T-RFLP na kůrovcových (B) a kontrolních (C) lokalitách podle délky umístění opadových sáčků v terénu (0, 1, 8, 13, 20, 25, 37 měsíců). Tabulka obsahuje dále celkový počet získaných fragmentů na kůrovcových a kontrolních lokalitách. Šedivě jsou vyznačeny hodnoty nad 10 ‰.

získané fragmenty	iniciální vzorky	1. měsíc		8. měsíc		13. měsíc		20. měsíc		25. měsíc		37. měsíc	
		lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C
71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82
73	4,11	0,00	0,00	0,00	5,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00
74	260,21	198,47	33,53	81,07	89,40	5,08	6,16	7,86	0,85	7,42	1,73	12,72	9,12
76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,04
80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27
81	0,00	0,00	7,28	0,00	0,00	0,00	20,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,15
82	0,00	1,22	9,69	0,64	0,00	4,66	36,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
83	2,33	0,00	5,17	0,00	0,00	0,00	11,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,57
88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,20
91	4,78	9,38	2,53	15,66	2,57	23,03	11,27	6,61	0,79	4,31	5,12	0,00	0,00
95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60
99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,72
101	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00	12,64	0,00	0,71	0,00	0,00	0,00	0,36	3,06
102	0,00	0,00	4,10	0,00	0,00	9,00	12,21	13,25	0,45	4,49	5,10	0,00	0,00
104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,36
105	0,00	0,00	9,10	0,00	2,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
106	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	56,60	0,00
107	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,87	0,00	8,20	130,42	5,94	6,72	238,49	226,10
108	1,62	11,40	73,57	21,56	28,08	321,03	237,56	479,41	210,19	264,67	167,35	0,00	0,00
109	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	30,42	0,00	99,00	4,62	14,32	4,07
110	0,00	0,00	20,91	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,73	1,81
111	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,68	0,00	3,30	1,24	0,00	0,00
114	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	2,61
115	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
116	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,67	21,88
117	0,00	0,00	1,77	0,00	4,68	8,77	7,78	2,19	37,61	22,40	9,85	0,00	0,00
118	0,00	0,70	0,00	12,07	9,56	31,88	2,01	12,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
126	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,06
128	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,98
132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	131,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
133	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,30	0,00	13,18	0,00	3,96	0,00	0,00	0,00
136	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,62	0,00	0,93	0,00	23,49	0,40	5,22	0,00
138	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,06	7,29
143	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,21	1,23
144	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,62	0,00	14,59	1,77	0,00	0,00
152	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,53
155	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,54	1,93
158	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,41
193	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
195	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,45
218	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20	1,77
222	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,64
224	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
225	22,47	1,40	2,38	1,03	7,46	0,00	0,40	6,32	0,86	6,33	8,99	0,00	0,00
226	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,34	0,00	0,00	12,49	10,09
227	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,65	0,77
228	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,39	0,80	0,00	0,00
231	0,00	0,00	2,02	0,00	0,00	0,00	1,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
232	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
239	13,76	0,00	4,55	0,00	6,04	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
240	0,00	0,00	0,00	0,00	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
255	0,00	0,00	1,54	0,00	1,29	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
257	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,83	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00
260	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,18	0,00	0,00	0,00
262	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,10	0,00
282	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,48	0,00
288	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
290	0,00	0,00	5,94	0,00	1,56	5,09	9,90	5,28	5,63	0,00	0,00	0,00	0,00
291	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	0,00	3,46	0,34	2,13	7,63
294	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,07	0,00
297	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,70	5,56
314	0,00	0,00	0,00	0,00	3,29	0,00	3,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
320	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71
324	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00
325	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,94	0,00
330	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,99
331	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,85
336	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,99	5,18
341	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,30	2,58
342	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
343	30,47	0,00	5,21	0,00	0,00	0,00	2,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
344	3,04	0,00	0,00	0,00	1,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
345	206,82	213,05	182,72	47,01	187,39	2,14	67,17	0,00	9,42	1,36	0,00	0,00	0,00
346	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	3,39
348	7,14	0,00	9,05	0,00	1,37	0,00	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
350	3,61	0,00	13,20	0,00	0,00	0,00	1,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
354	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,69	0,00	0,00	0,00
356	8,19	0,00	9,67	0,00	0,00	0,00	1,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
358	0,00	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,09	0,56	0,00	2,33
359	2,40	0,00	3,26	0,00	0,65	0,00	9,47	0,00	0,00	0,00	0,00	15,60	51,75

Příloha 5: Pokračování

získané fragmenty	iniciální vzorky	1. měsíc		8. měsíc		13. měsíc		20. měsíc		25. měsíc		37. měsíc	
		lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C	lokalita B	lokalita C
360	0,00	0,00	13,21	0,00	0,57	0,00	1,63	0,00	0,00	0,00	0,00	5,46	13,74
361	3,98	0,00	3,33	0,00	5,22	1,84	22,65	0,00	0,56	7,18	2,80	0,00	0,00
362	0,00	0,00	1,11	0,00	4,40	0,80	42,72	3,33	23,35	47,60	40,46	9,28	10,09
363	40,91	0,00	34,43	0,00	5,98	0,00	17,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
364	0,00	4,32	0,00	0,00	0,00	55,18	0,00	82,71	21,62	150,86	157,74	0,00	0,00
365	69,84	68,78	82,14	75,41	72,06	15,50	8,82	5,20	0,00	19,30	0,00	80,15	83,11
366	0,00	2,31	0,00	2,59	0,00	0,60	0,00	35,97	16,71	123,35	87,09	142,73	161,00
367	60,22	24,05	21,69	10,48	28,79	14,57	9,64	21,44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
369	2,68	0,00	3,22	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	1,15	0,97
370	1,96	0,00	7,37	0,00	5,03	0,00	2,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
371	0,00	11,10	0,00	1,68	1,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
372	2,89	7,23	23,94	0,00	2,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,23	3,40
374	13,39	30,00	36,83	0,00	2,09	0,00	3,62	0,00	0,00	3,50	1,05	3,81	2,96
375	22,54	55,17	77,97	2,39	2,94	0,00	7,55	0,00	0,00	0,00	1,11	0,00	0,00
376	52,03	157,52	92,08	0,00	0,00	0,00	6,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
377	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,27
378	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
380	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,58	4,48
382	0,00	0,00	8,43	0,00	0,00	0,00	1,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
383	2,17	0,00	14,82	0,00	1,73	0,00	2,29	0,00	2,62	0,00	58,51	0,00	0,00
384	145,35	175,78	126,09	204,33	151,93	124,03	84,94	29,56	9,48	26,11	0,00	6,91	12,72
385	1,89	4,52	10,93	380,76	321,54	152,79	82,91	86,96	208,25	59,81	289,86	0,00	0,00
386	9,11	13,24	9,06	58,02	27,28	30,62	22,76	19,97	93,01	16,83	22,50	3,95	15,63
388	0,00	0,00	2,86	0,00	6,37	0,00	17,66	2,68	33,62	0,00	0,00	0,00	0,00
389	0,00	2,69	0,94	49,65	1,13	22,16	0,00	6,14	0,00	13,46	26,90	5,03	26,70
391	0,00	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,82	0,39	0,00	0,00
394	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42	0,00	0,36	1,89
395	0,00	0,00	10,10	0,00	0,00	0,00	1,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
398	0,00	0,00	5,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	67,24	39,41
403	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	79,48	0,00
404	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23,53	0,00	0,00	0,00	0,00	10,07	0,00
406	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,01	7,95
407	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,46	6,64
417	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
420	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	9,62
421	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,83	45,02
438	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28
440	0,00	0,00	3,69	0,00	0,00	0,00	8,61	0,00	0,00	0,00	0,00	12,41	7,93
441	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00	9,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
448	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,14
počet fragmentů	28	22	46	17	34	31	50	28	20	32	25	47	59

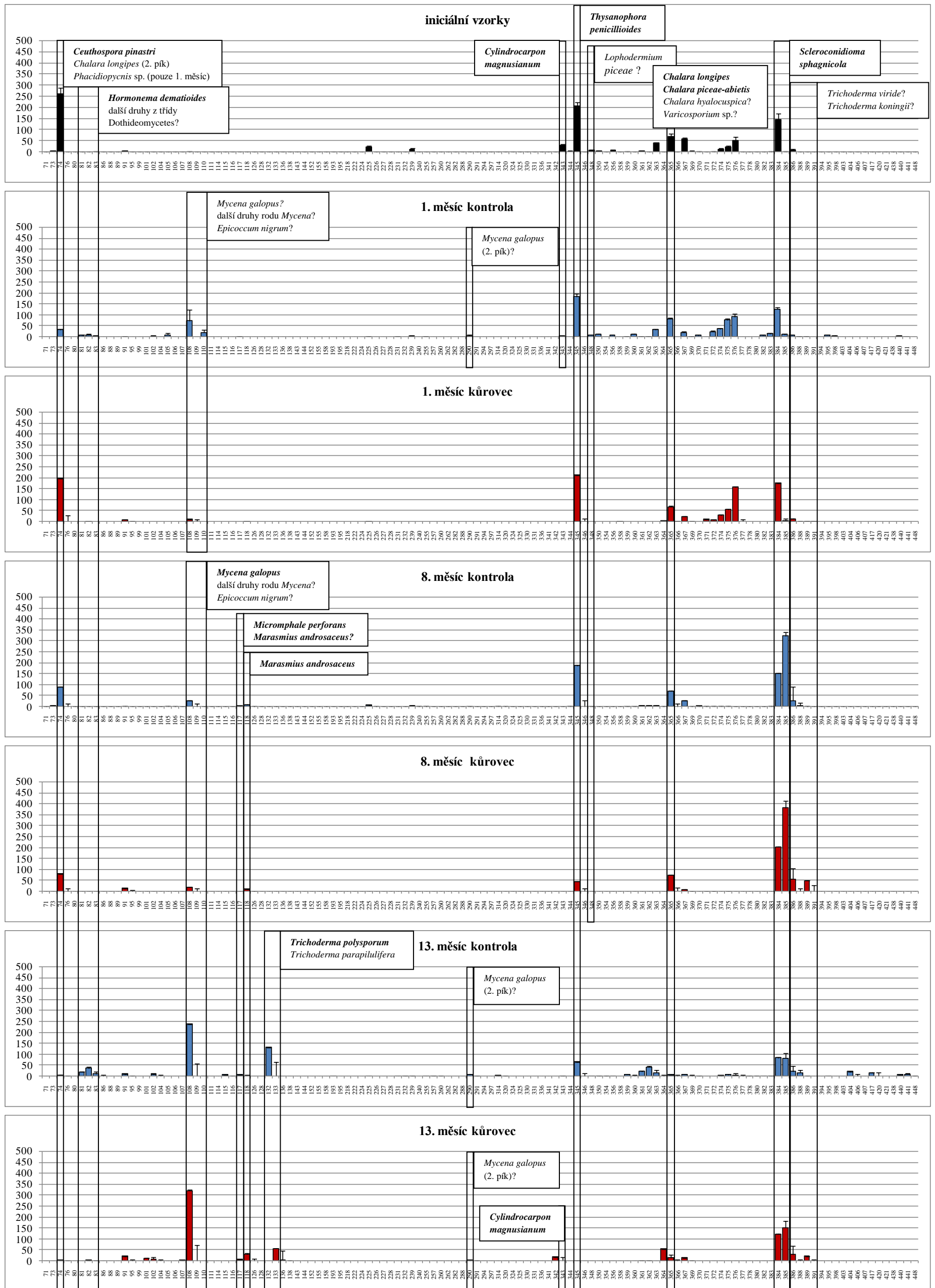
Příloha 6: Délky fragmentů získaných virtuálním štěpením ITS rDNA vybraných druhů hub enzymem NlaIII. Tučně je označen kmen vybraný z kultivace jehlic, eventuelně vybraný druh z GenBanku a pod ním jsou slabě označeny druhy s podobnou sekvencí použité k doplnění chybějících konců štěpené sekvence. U několika druhů je přidána reálná délka fragmentů vznikajících při T-RFLP.

druh houby	místo štěpu od primeru ITS1F		
	virtuálně	T-RFLP	
		hlavní pík	vedlejší píky
ZK217 <i>Botrytis cinerea</i>	79	-	-
gb GU055551.1 uncultured <i>Botryotinia</i> clone	79	-	-
ZK207 <i>Ceuthospora pinastri</i>	79	74	224
ZK205 <i>Ceuthospora pinastri</i>	79	-	-
dbj AB511811.1 <i>Leotiomyces</i> sp.	78	-	-
ZK218 <i>Cistella</i> sp.	366	-	-
gb EF434019.1 uncultured fungus	368	-	-
ZK151 <i>Cylindrocarpon magnusianum</i>	343	337	238
ZK373 <i>Entomocorticium</i> sp.	227	-	-
gb DQ118419.1 <i>Entomocorticium dendroctoni</i>	227	-	-
emb FR837930.1 <i>Entomocorticium</i> sp.	87	-	-
ZK197 <i>Epicoccum nigrum</i>	109	-	-
GU566259.1 <i>Epicoccum nigrum</i>	109	-	-
gb DQ491405.1 <i>Fomitopsis pinicola</i>	115	-	-
gb HM037940.1 <i>Fusarium tricinctum</i>	322	-	-
ZK236 <i>Fusicladium</i> sp.	nenalezen úsek ITS1F		
ZK381 <i>Hypocreales</i> sp.	381	-	-
gb AY245643.1 <i>Tolypocladium inflatum</i>	367	-	-
ZK316 <i>Helotiales</i> sp. 1	369	-	-
gb AY394885.1 <i>Meliniomyces bicolor</i>	371	-	-
emb FA669230.1 <i>Meliniomyces</i> sp.	371	-	-
ZK234 <i>Herpotrichi juniperi</i>	nenalezen úsek ITS1F		
ZK194 <i>Hormonema dematioides</i>	87	83	104, 370, 386, 385
gb GQ153122.1 <i>Dothideomyces</i> sp.	85	-	-
ZK267 <i>Chalara hyalocuspica</i>	365	-	-
ZK261 <i>Chalara longipes</i>	365	74	224
ZK201 <i>Chalara longipes</i>	365	365	224
ZK204 <i>Chalara piceae-abietis</i>	366	365	226
gb EU040232.1 <i>Hyalodendriella betulae</i>	367	-	-
ZK348 <i>Ischnoderma benzoinum</i>	110	-	-
gb FJ711053.1 <i>Ischnoderma benzoinum</i>	110	-	-
gb FR837918.1 <i>Lophodermium piceae</i>	349	-	-
gb GQ303278.1 <i>Minimedusa obcoronata</i>	bez štěpu	-	-
gb GU234007.1 <i>Marasmius androsaceus</i>	118	-	-
ZK266 <i>Micromphale perforans</i>	117	-	-
gb AF505780.1 <i>Micromphale foetidum</i>	449	-	-
ZK199 <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	bez štěpu	bez štěpu	
gb AY243950.1 <i>Mucor hiemalis</i> f. <i>corticola</i>	bez štěpu	-	-
emb AM901686.1 <i>Mucor</i> sp.	bez štěpu	-	-

Příloha 6: Pokračování

Druh houby	místo štěpu od primeru ITS1F		
	virtuálně	T-RFLP	
		hlavní pík	vedlejší píky
ZK362 <i>Mycena galopus</i>	110	107	290,103,231,232
gb JF908402.1 <i>Mycena arcangeliana</i>	111	-	-
gb JF908410.1 <i>Mycena filopes</i>	109	-	-
gb HM240534.1 <i>Mycena galopus</i>	110	-	-
gb JF908484.1 <i>Mycena galopus</i>	111	-	-
gb HQ604768.1 <i>Mycena haematopus</i>	110	-	-
gb JF908412.1 <i>Mycena metata</i>	111	-	-
gb JF908403.1 <i>Mycena pura</i>	103	-	-
ZK193 <i>Phacidiopycnis</i> sp. 1	78	-	-
gb AY561208.1 Foliar endophyte of <i>Picea glauca</i>	79	-	-
gb AY163558.1 <i>Rhinocladiella atrovirens</i>	395	-	-
emb AM884745.1 <i>Rhizosphaera macrospora</i>	385	-	-
gb AY183366.1 <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	385	-	-
ZK191 <i>Scleroconidioma sphagnicola</i>	385	384	240
gb AY220610.1 <i>Scleroconidioma sphagnicola</i>	385	-	-
ZK190 <i>Thysanophora penicillioides</i>	348	345	238
gb AB175250.1 <i>Thysanophora penicillioides</i>	346	-	-
ZK352 <i>Trametes versicolor</i>	109	-	-
gb JF437649.1 <i>Trametes versicolor</i>	109	-	-
ZK237 <i>Trichoderma koningii</i>	391	-	-
gb FJ430783.1 <i>Hypocrea koningii</i>	391	-	-
ZK294 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	166	-	-
ZK273 <i>Trichoderma parasilulifera</i>	135	132	241
gb FJ860799.1 <i>Hypocrea parasilulifera</i>	135	-	-
ZK195 <i>Trichoderma pleuroticola</i>	409	-	-
EU280071.1 <i>Trichoderma pleuroticola</i>	408	-	-
ZK208 <i>Trichoderma polysporum</i>	135	132	243
ZK198 <i>Trichoderma viride</i>	390	-	-
gb FJ481123.1 <i>Trichoderma viride</i>	390	-	-
ZK211 <i>Varicosporium elodeae</i>	365	-	-
gb EU998923.1 <i>Articulospora tetracladia</i>	79	-	-

Příloha 7: Grafy přítomnosti fragmentů T-RFLP na kůrovcových (červená) a kontrolních lokalitách (modrá) v jednotlivých měsících odběru. Osa x znázorňuje délku fragmentu (průměr + S.E.), osa y relativní četnost fragmentu odpovídající množství fluorescence.



Příloha 7: Pokračování

