

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



**Význam společenstev arbuskulárně mykorhizních hub pro růst
vybraných rostlinných druhů na opuštěném poli**

Bc. Alena Voříšková

Diplomová práce

Praha, 2014

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Martina Janoušková Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. RNDr. Jana Albrechtová Ph.D.

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, 30.4. 2014

Alena Voříšková

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK) – grant č. 574312 (2012 - 2014) a Grantové agentury České republiky (GA ČR) – grant č. 504/10/1486 (2010 – 2014).

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala zejména své školitelce Mgr. Martině Janouškové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a za vstřícný přístup, čas a rady, které mi v průběhu vytváření této práce věnovala.

Také děkuji prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. za konzultaci, doc. RNDr. Zuzaně Münzbergové, Ph.D. za rady při statistickém zpracování dat a Mgr. Ondřeji Danielovi za obětavou pomoc při analýze molekulárních dat. Také zbytku mykorhizního oddělení za přátelský přístup, obzvláště kolegům ze studentské místnosti za vytvoření pozitivní a veselé atmosféry při psaní diplomové práce.

V neposlední řadě také velký dík patří mé rodině a přátelům za podporu a trpělivost při tvorbě diplomové práci i po dobu celého studia.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlivem arbuskulárně mykorhizní (AM) symbiózy na růst vybraných rostlin na lokalitě v Českém středohoří zajímavé těsným sousedstvím polopřirozeného suchého trávníku a pole opuštěného v 90. letech 20. století. Toto uspořádání je charakteristické pro mozaiku biotopů v regionu. Práce vychází z předchozích poznatků, že některé druhy rostlin, které se běžně vyskytují na polopřirozených suchých trávnících, nekolonizují opuštěná pole. Vzhledem k významu AM symbiózy pro diverzitu a produktivitu rostlinných společenstev byla vznesena hypotéza, že by za tento jev mohly být zodpovědné změny ve společenstvu AM hub opuštěného pole.

Tato hypotéza byla testována ve skleníkovém nádobovém experimentu s třemi taxonomicky příbuznými páry rostlin, kde vždy jeden rostlinný druh nebyl schopen kolonizovat opuštěné pole a druhý tento biotop kolonizoval. Byl sledován růst a příjem fosforu rostlinami v půdě z obou biotopů při křížové inokulaci společenstvy AM hub z těchto biotopů. Experiment byl doplněn o popis společenstev AM hub v kořenech šesti párů rostlin z lokality pomocí analýzy polymorfismu délek terminálních restričních fragmentů (T-RFLP).

Skleníkový experiment ukázal, že ač všechny testované rostliny vykazovaly pozitivní odpověď na mykorhizu, původ inokula neměl na růst rostlin podstatný vliv. Rostliny lépe rostly v půdě ze suchého trávníku, avšak mykorhizní odpověď rostlin byla výraznější v půdě z opuštěného pole. Mykorhizní odpověď rostlin závisela na jejich taxonomické příslušnosti, rostlinné druhy obou ekologických skupin se v mykorhizní odpovědi konzistentně nelišily. Složení společenstev AM hub na lokalitě bylo ovlivněno biotopem spíše než rostlinným druhem, přičemž na opuštěném poli byla zaznamenána vyšší druhová bohatost AM hub i vyšší frekvence jednotlivých druhů v kořenových systémech.

AM symbióza tedy pravděpodobně nemá příliš velký vliv na schopnost rostlin kolonizovat opuštěné pole. Ze složení společenstev AM hub je patrné, že na tomto biotopu došlo k jejich přirozené obnově po předchozím intenzivním zemědělském využívání.

KLÍČOVÁ SLOVA: arbuskulární mykorhizní symbióza, arbuskulárně mykorhizní houby, opuštěné pole, mykorhizní růstová odpověď, T-RFLP

ABSTRACT

The thesis deals with the effect of arbuscular mycorrhiza (AM) on the growth of selected plant species at a locality in České středohoří. This locality is characterized by close neighborhood of a semi-natural dry grassland and a former field abandoned in the 1990s, typical for the mosaic of biotopes in the region. The study is based on previous findings that some plant species, which are common at the semi-natural dry grasslands, do not colonize the abandoned fields. As AM is an important factor affecting diversity and productivity of plant communities we hypothesized that this phenomenon could be related to changes in AM fungal communities at the abandoned field.

The hypothesis was tested in a greenhouse pot experiment with three taxonomically related pairs of plant species, always one species growing at the abandoned field and the second one not. Growth and phosphorus uptake of the plants was followed in soils of both biotopes after factorial inoculation with AM fungal communities from both biotopes. The experiment was complemented by description of AM fungal communities in the roots of six plant species pairs from the locality using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP).

The greenhouse experiment revealed positive mycorrhizal response in all plant species, but the origin of inoculum did not have any substantial effect. Plants grew better in the soil from the dry grassland, but mycorrhizal response was more pronounced in the soil from the abandoned field. The mycorrhizal response of a plant species depended on taxonomic group, plants of the two ecological groups did not consistently differ in mycorrhizal response. The composition of AM fungal communities was affected rather by biotope than by plant species. Root samples from the abandoned field had higher diversity and frequency of AM fungal taxa.

Thus, AM symbiosis probably does not influence the ability of plants to colonize the abandoned field. The composition of AM fungal communities at this biotope indicates their restoration after previous intensive agricultural practice.

KEY WORDS: arbuscular mycorrhizal symbiosis, arbuscular mycorrhizal fungi, abandoned field, mycorrhizal growth response, T-RFLP

POUŽITÉ ZKRATKY:

AM symbióza – arbuskulární mykorhizní symbióza (arbuscular mycorrhizal symbiosis)

AM houby – arbuskulárně mykorhizní houby (arbuscular mycorrhizal fungi)

CCA – kanonická korespondenční analýza (canonical correspondence analysis)

DCA – detrendovaná korespondenční analýza (detrended correspondence analysis)

MR – mykorhizní odpověď (mycorrhizal response)

OTU – operační taxonomická jednotka (operational taxonomic unit)

T-RFLP – polymorfismus délek terminálních restrikčních fragmentů (terminal restriction fragment length polymorphism)

TRF – terminální restrikční fragment (terminal restriction fragment)

OBSAH:

1. ÚVOD:	- 9 -
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED:	- 11 -
2.1. Mykorhizní symbióza	- 11 -
2.1.1. Arbuskulární mykorhizní symbióza	- 12 -
2.1.1.1. Genetika AM hub	- 13 -
2.2. Opuštěná pole a biodiverzita	- 14 -
2.2.1. Kolonizace opuštěných polí rostlinami	- 14 -
2.2.2. Sukcese AM hub na opuštěná pole	- 15 -
2.3. Vliv různých faktorů na složení společenstva AM hub	- 16 -
2.3.1. Vliv abiotických faktorů na složení společenstva AM hub	- 16 -
2.3.2. Vliv biotických faktorů na složení společenstva AM hub	- 17 -
2.4. Význam AM hub pro růst rostlin	- 17 -
2.4.1. Závislost a odpověď rostlin na mykorhizu	- 18 -
2.4.2. Vliv identity AM hub na růst rostlin	- 19 -
2.4.3. Vliv společenstva AM hub na růst rostlin	- 21 -
2.5. Metody popisu společenstev AM hub	- 22 -
2.5.1. Polymorfismus délek terminálních restričních fragmentů (T-RFLP)	- 23 -
3. MATERIÁL A METODY:	- 25 -
3.1. Popis lokality	- 25 -
3.2. Skleníkový nádobový experiment	- 27 -
3.2.1. Popis experimentu	- 28 -
3.2.2. Založení experimentu	- 28 -
3.2.3. Sklizení experimentu	- 29 -
3.2.4. Vyhodnocování experimentu	- 29 -
3.2.5. Statistická analýza nádobového experimentu	- 31 -
3.3. T-RFLP analýza společenstev AM hub na lokalitě	- 31 -
3.3.1. Extrakce DNA	- 33 -
3.3.1.1. Elektroforéza	- 33 -
3.3.2. Tvorba knihovny sekvencí z lokality	- 34 -
3.3.2.1. Amplifikace	- 34 -
3.3.2.2. Purifikace	- 37 -
3.3.2.3. Klonování	- 37 -
3.3.2.4. Úprava sekvencí a konstrukce fylogenetického stromu	- 39 -
3.3.3. Analýza vzorků pomocí T-RFLP	- 40 -
3.3.3.1. Analýza kořenových vzorků z lokality	- 41 -
3.3.3.2. Faktická versus pozorovaná délka TRF	- 42 -

3.3.3.3. OTU spadající do vymezených rozsahů délek TRF	- 45 -
3.3.4. Zpracování a vyhodnocování dat	- 47 -
3.3.5. Statistická analýza T-RFLP	- 47 -
4. VÝSLEDKY.....	- 49 -
4.1. Vyhodnocení skleníkového nádobového experimentu.....	- 49 -
4.1.1. Kolonizace	- 49 -
4.1.2. Nadzemní suchá biomasa.....	- 50 -
4.1.3. Kořenová suchá biomasa	- 52 -
4.1.4. Koncentrace fosforu v nadzemní biomase rostlin	- 54 -
4.1.5. Mykorhizní odpověď.....	- 56 -
4.1.6. Korelace mezi kolonizací kořenů a mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin ...	- 62 -
4.2. Vyhodnocení společenstva AM hub v kořenech rostlin z lokality	- 64 -
4.2.1. Frekvence OTU ve vzorcích	- 64 -
4.2.2. Druhová bohatost AM hub v rostlinných druzích na lokalitě	- 65 -
4.2.3. Mnohorozměrné analýzy společenstev AM hub na lokalitě	- 66 -
4.2.3.1. Zachycení hlavního směru variability v datech - nepřímá DCA	- 67 -
4.2.3.2. Vliv biotopu na výskyt AM hub - přímá CCA analýza.....	- 68 -
4.2.3.3. Vliv rostlinných druhů na společenstvo AM hub - přímá CCA analýza	- 69 -
5. DISKUZE:.....	- 72 -
5.1. Diskuze skleníkového nádobového experimentu	- 72 -
5.2. Společenstva AM hub na lokalitě.....	- 78 -
5.3. Syntéza výsledků skleníkového nádobového experimentu s poznatky o složení společenstev AM hub na lokalitě.....	- 81 -
6. SOUHRN	- 83 -
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 84 -
8. PŘÍLOHY	- 97 -

1. ÚVOD:

Na počátku 20. století nastal velký tlak na vytváření nových zemědělských ploch. Krajina byla měněna a z polopřirozených stanovišť se stávala stanoviště obhospodařovaná. Od 50. let dvacátého století pak probíhal proces scelování ploch a intenzifikace zemědělství. Se socioekonomickou změnou 90. let pak byla část intenzivně obdělávaných polí opuštěna, začala ležet ladem a byla ponechána sekundární sukcesi. Ač již dvacet let neobdělávané, tyto biotopy se stále vyznačují nižší biodiverzitou než biotopy bez této historie intenzivního obdělávání.

Opuštěná pole mohou mít v důsledku obhospodařování změněné abiotické podmínky. Ty mohou ovlivňovat nejen rostlinná společenstva, ale i společenstva mikrobiální. Významnou složkou mikrobiálních společenstev jsou běžně se vyskytující arbuskulárně mykorhizní (AM) houby, které s rostlinami tvoří arbuskulární mykorhizní symbiózu. Rostliny mohou mít prospěch ze symbiotického vztahu v podobě živin, které získávají od AM hub a naopak houbám poskytují uhlík z fotosyntézy. Přestože je tento vztah považován za hostitelsky nespecifickou interakci, bylo zjištěno, že druhová bohatost a identita AM hub je důležitá pro růst rostlin a složení rostlinných společenstev (van der Heijden *et al.*, 1998).

V Českém středohoří jsou opuštěná pole významným krajinným prvkem. Nachází se zde i naše studovaná lokalita, která se vyznačuje tím, že k opuštěnému poli těsně přiléhá polopřirozený suchý trávník. Rostlinná diverzita opuštěného pole je nižší a některé druhy rostlin, které se běžně vyskytují na suchém trávníku, opuštěné pole nekolonizují (Chýlová & Müenzbergová, 2008; Knappová *et al.*, 2012). Opuštěné pole může mít v důsledku předchozího intenzivního obhospodařování také odlišné či méně bohaté společenstvo AM hub než je tomu na vedlejším polopřirozeném suchém trávníku, což by mohlo ovlivňovat schopnost rostlin kolonizovat tento biotop.

Cílem této práce je podpořit nebo vyvrátit hypotézu, že společenstva AM hub se liší mezi oběma biotopy a některé druhy rostlin se nešíří na opuštěné pole právě z důvodu změn ve společenstvu AM hub.

Hypotéza:

Některé rostlinné druhy ze suchého trávníku nekolonizují opuštěné pole z důvodu odlišného společenstva AM hub.

Hlavní cíl:

Zjistit, zda AM symbióza může ovlivňovat kolonizaci opuštěného pole některými rostlinnými druhy.

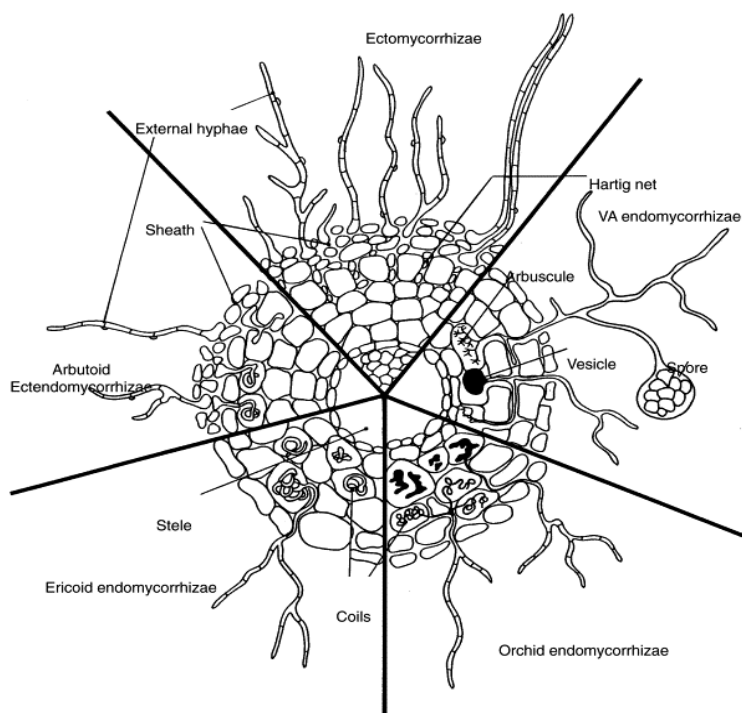
Dílčí otázky:

- 1. Liší se rostlinné druhy schopné kolonizovat opuštěné pole v závislosti na AM symbióze od druhů, které opuštěné pole nekolonizují?*
- 2. Liší se mykorhizní odpověď těchto rostlinných druhů v půdě ze suchého trávníku a z opuštěného pole, a závisí na tom, zda je mykorhiza tvořena společenstvem AM hub z jednoho či druhého biotopu?*
- 3. Liší se složení společenstev AM hub ze suchého trávníku a z opuštěného pole?*

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED:

2.1. Mykorhizní symbióza

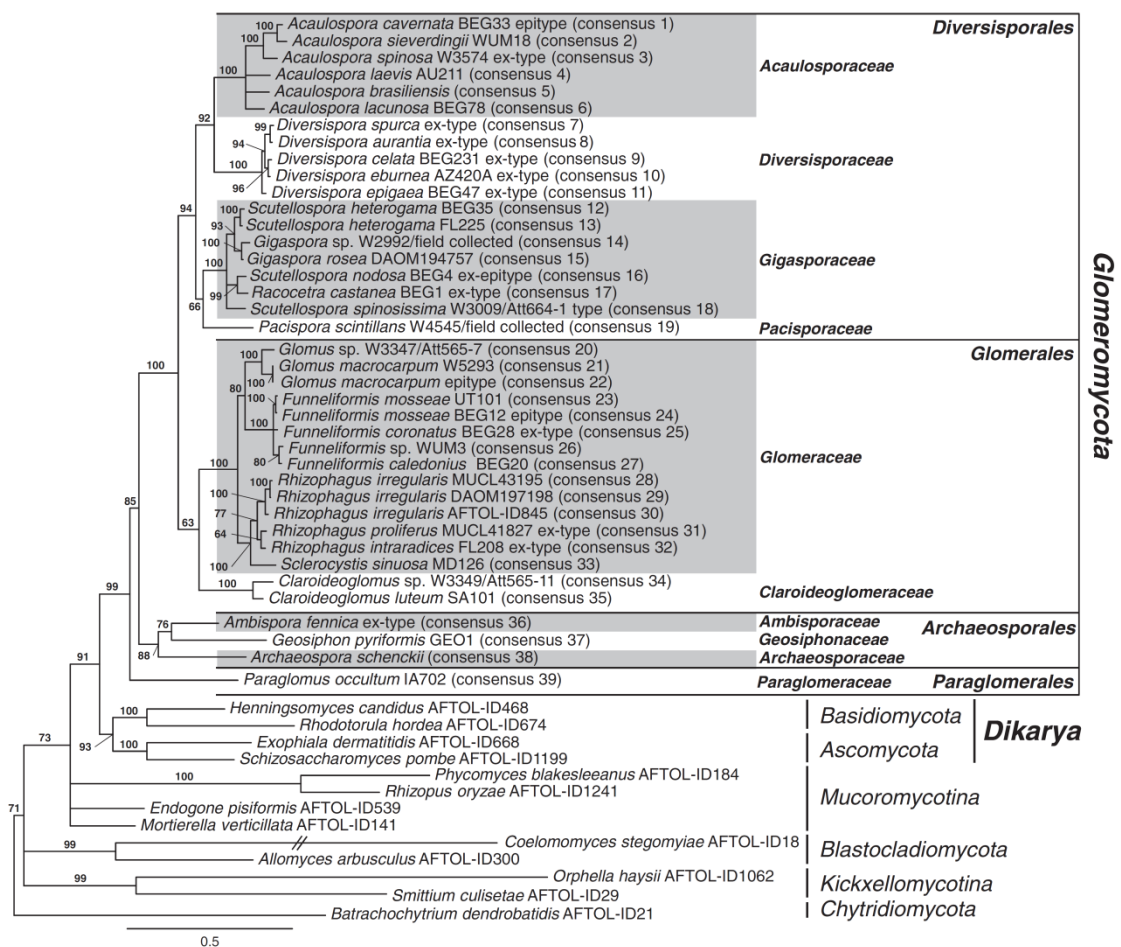
Mykorhizní symbióza (též mykorhiza), vztah mezi kořeny rostlin a houbovými symbionty, je jednou z nejstarších a nejrozšířenějších symbióz na Zemi, která se objevila již před 420 miliony let při přechodu rostlin na souš. V současnosti tvoří některou z jejích forem téměř 90 % cévnatých rostlin. Obecný vztah mezi rostlinou a houbovým symbiontem funguje na základě principu „výměnného obchodu“. Rostlina poskytuje houbě organický uhlík původem z fotosyntézy a naopak houba dodává rostlině minerální živiny z půdy. Čtyřmi nejběžnějšími typy mykorhizy jsou arbuskulární mykorhiza, ektomykorhiza, erikoidní mykorhiza a orchideoidní mykorhiza. Jednotlivé typy mykorhizní symbiózy se rozlišují podle hub, které ji tvoří, a struktury, které vytvářejí uvnitř či vně kořenů rostlin (Obr. 1). Tato diplomová práce je zaměřená na arbuskulární mykorhizní symbiózu.



Obr. 1: Schematické zobrazení jednotlivých typů mykorhizní symbiózy na řezu kořene se strukturami, které houby tvoří uvnitř i vně kořene (převzato z Selosse & Le Tacon (1998)).

2.1.1. Arbuskulární mykorhizní symbióza

Arbuskulární mykorhizní (AM) symbióza, též arbuskulární mykorhiza je nejběžnějším a nejpůvodnějším typem mykorhizní symbiózy. Vyskytuje se u téměř 80 % druhů cévnatých rostlin (Smith & Read, 1997). AM symbióza tvoří arbuskulárně mykorhizní (AM) houby z deseti čelení kmene Glomeromycota (Obr. 2), které byly dříve řazeny do kmene Zygomycota. Celkem bylo popsáno jen asi 250 druhů AM hub (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>), které jsou považovány za hostitelsky nespecifické, protože kolonizují široké spektrum rostlinných hostitelů (Smith & Read, 1997).

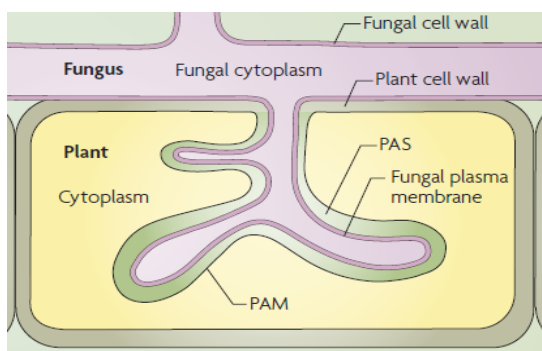


Obr. 2: Fylogenetický strom založený na sekvencích asi 2700 bp dlouhého fragmentu jaderné ribozomální DNA zahrnujícím malou podjednotku, 5,8S a část velké podjednotky. Glomeromycota tvoří monofyletickou skupinu (převzato z Krüger *et al.* (2012)).

AM houby jsou obligátně závislé na svém hostiteli a nemohou dlouhodobě přežít bez něj. AM houby tvoří spory, které v příhodných podmínkách v půdě klíčí a vytvářejí mycélium, které kolonizuje kořen hostitelské rostliny. Houbové hyfy pronikají

přes kořenovou pokožku do primární kůry, kde vstupují do buněk hostitele. Pronikají buněčnou stěnou rostliny, ale nepenetrují plasmatickou membránu (Obr. 3). Mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou rostliny tvoří rozvětvené struktury, které se nazývají arbuskule. Mezi buněčnou stěnou houby a rostlinnou plasmatickou membránou (nazývanou periarbuskulární membrána) se tvoří mezilehlý prostor. Na arbuskulích probíhá výměna uhlíku a živin mezi oběma hostiteli. Další houbové struktury, které se nachází v kořeni, jsou vezikule, které plní zásobní funkci.

Z kolonizovaného hostitelského kořene vyrůstají ven hyfy a tvoří hyfovou síť mimokořenového mycélia. Mimokořenové mycélium, které prorůstá velkým objemem půdy, čerpá z ní minerální živiny a transportuje je přes vnitrokořenové mycélium do rostliny.



Obr. 3: Schematické znázornění vnitřku rostlinné buňky s arbuskulí. PAS – mezilehlý prostor, PAM - periarbuskulární membrána (převzato z Parniske (2008)).

2.1.1.1. Genetika AM hub

AM houby tvoří nepřehrádkované (cenocytické) mycéliem, které obsahuje velké množství jader. U některých druhů AM hub se v mimokořenovém mycéliu tvoří tzv. anastomózy – hyfové spoje, které propojují větve mycélia a vytvářejí tak hyfovou síť, kterou proudí cytoplasma, a migrují jádra. Anastomózy mohou přispívat k udržení genetické homogenity v rámci celého individua (Giovannetti *et al.*, 2001). Mohou se tvořit i mezi mycélii, které nepochází ze stejné spory, ale jsou stejného druhu (Giovannetti *et al.*, 1999) a přispívají tak k tvorbě rozsáhlých hyfových sítí (Smith & Read, 1997). U AM hub nebyla pozorována tvorba sexuálních stádií (Smith & Read, 1997), jejich reprodukce tedy pravděpodobně probíhá pouze asexuálně.

Spory AM hub jsou mnohoaderné. Počet jader v jedné spoře se značně liší a pohybuje se až v řádu tisíců (Viera & Glenn, 1990). Na vnitrodruhové úrovni byla objevena vysoká genetická variabilita AM hub (Rosendahl & Taylor, 1997), která je přisuzována genetické variabilitě mezi jednotlivými jádry (Sanders *et al.*, 1996;

Lanfranco *et al.*, 1999). V podstatě tak u AM hub nelze hovořit o jedincích, protože i základní jednotka, spora, je vlastně populací různých jader.

Druhy AM hub jsou popsány na základě morfologických charakteristik spor, avšak díky molekulárně genetickým přístupům dnes víme, že u AM hub existuje vysoká skrytá diverzita genotypů, které nelze přiřadit k žádnému z popsaných druhů (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Další složkou skryté genetické diverzity AM hub je vysoká genetická variabilita na vnitrodruhové úrovni (Sanders *et al.*, 1996; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001), která znesnadňuje vymezení a identifikaci druhů.

2.2. Opuštěná pole a biodiverzita

Polopřirozené trávníky s vysokou biodiverzitou jsou běžnou součástí evropské krajiny. Ve 20. století docházelo v Evropě k intenzifikaci zemědělství. Vznikalo velké množství intenzivně zemědělsky obdělávaných ploch a zároveň mizela polopřirozená stanoviště. Později se socioekonomickým vývojem docházelo ke snižování rozsahu zemědělských ploch v důsledku redukce zemědělství (shrnutí v Cramer *et al.*, 2008). Tímto způsobem vznikaly v krajině nevyužité plochy se značně sníženou bohatostí rostlinných druhů. Některé rostlinné druhy polopřirozených suchých trávníků však jsou schopné tyto lokality kolonizovat v řádu desítek let po opuštění lokality (Münzbergová & Chýlová, 2008). Způsob, jakým byla lokalita v minulosti zemědělsky využívána, hraje důležitou roli při kolonizaci těchto biotopů rostlinami (Münzbergová & Chýlová, 2008).

2.2.1. Kolonizace opuštěných polí rostlinami

Polopřirozená stanoviště mohou sloužit jako zdroj obnovy rostlinné biodiverzity na opuštěných polích. Největší množství rostlinných druhů se šíří na biotop během prvních přibližně 5 let od opuštění obdělávaného pole, pak se proces kolonizace těchto biotopů výrazně zpomaluje (Bartha *et al.*, 2003). Nicméně proces kolonizace je dlouhodobou záležitostí a s přibývajícím časem se zvyšuje biodiverzita lokality. Podle práce Ruprecht (2006) mohou mít opuštěná pole podobnou rostlinnou diverzitu jako přirozená stanoviště již po 20 letech, na druhou stranu však mohou mít i po více než 50 letech od opuštění pole stále výrazně nižší druhovou bohatost než těsně přilehlý polopřirozený trávník (Öster *et al.*, 2009). Menší vzdálenost od polopřirozeného

stanoviště umožňuje rychlejší šíření rostlin na lokality (Fagan *et al.*, 2008). Chemické a fyzikální změny půdy na lokalitě mohou ovlivňovat interakce mezi rostlinnými druhy. V důsledku předchozího hospodaření je často na těchto plochách dostatečná nebo i zvýšená dostupnost živin. Rychle rostoucí rostlinné druhy, které jsou schopny lokality kolonizovat, mohou zpočátku potlačit pomaleji rostoucí druhy (Brussaard *et al.*, 1996). Zvýšené množství živin v půdě opuštěného pole může zabraňovat spontánní kolonizaci některými druhy rostlin z polopřirozených stanovišť (Cousins & Lindborg, 2008). Důležitou roli v kolonizaci opuštěných polí rostlinami však hrají nejen faktory abiotické, ale i faktory biotické, jako jsou půdní mikroorganismy (Carbajo *et al.*, 2011). Právě arbuskulárně mykorhizní houby, jako důležitá součást půdních mikrobiálních společenstev, může být jedním z těchto faktorů (Eschen *et al.*, 2009).

2.2.2. Sukcese AM hub na opuštěná pole

Množství propagulí AM hub v půdě rychle stoupá s přibývajícím množstvím hostitelských druhů rostlin (Piotrowski & Rillig, 2008) a složení společenstva AM hub na opuštěném poli se mění v čase. (Johnson *et al.*, 1991) popsali výskyt některých druhů AM hub jen v časném sukcesním stádiu, jiných pak jen v pozdějších sukcesních stádiích. Přitom se druhová bohatost společenstva AM hub v čase neměnila, ale docházelo ke zvýšení jeho vyrovnanosti. K zástupcům hojně kolonizujícím raná sukcesní stadia patřil druh *Scutellospora persica*, *Acaulospora elegans* se naopak hojně vyskytovala v pozdější fázi sukcese (Johnson *et al.*, 1991).

Výchozí společenstvo AM hub na opuštěném poli je dáno propagulemi, které se již v půdě nachází a odráží se v něm historie lokality. Množství a diverzita těchto propagulí jsou ovlivněny intenzitou zemědělství, ale také dobou uplynulou od opuštění pole. Spory AM hub obecně mohou přežívat v půdě poměrně dlouhou dobu.

Propagule AM hub (ve formě spor, fragmentů hyf a kolonizovaných kořenů) však také migrují z vedlejších lokalit a tak se může společenstvo AM hub měnit (Piotrowski & Rillig, 2008). Migrace za pomoci větru není primárním způsobem šíření AM hub, avšak může dojít k návratu spor AM hub na lokalitu (Allen *et al.*, 1989). Bylo popsáno několik různých variant přenosu spor za pomoci hlodavců (Mangan & Adler, 2002), členovců (Klironomos & Moutoglou, 1999), nebo lidskou činností (Schwartz *et al.*, 2006). Spory jednotlivých čeledí AM hub se liší ve velikosti, což může mít za následek rozdíly ve schopnosti migrace (Klironomos & Moutoglou, 1999).

2.3. Vliv různých faktorů na složení společenstva AM hub

Jak již bylo předestřeno v předcházející kapitole, společenstva AM hub se mohou vyvíjet a dynamicky měnit pod vlivem mnoha různých faktorů. Mohou to být abiotické faktory na lokalitě související s její historií, ale také biotické faktory a interakce s ostatními organismy. Abiotické a biotické faktory se mohou překrývat a doplňovat. Mohou vytvářet tlak na selekci spíše specializovaných taxonů AM hub na konkrétní typ prostředí anebo naopak generalistů schopných existovat v široké škále podmínek.

2.3.1. Vliv abiotických faktorů na složení společenstva AM hub

Výskyt AM hub a tedy složení jejich společenstev je ovlivněn řadou abiotických faktorů. Významným faktorem je množství živin v půdě (Johnson, 1993; Ezawa *et al.*, 2000; Jumpponen *et al.*, 2005; Toljander *et al.*, 2008). Zvyšováním množství dusíku v půdě dochází k selekčnímu tlaku na určité rody např. *Glomus*, přičemž některé rody (*Gigaspora* a *Scutellospora*) naopak mizí (Egerton-Warburton & Allen, 2000). Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje společenstvo AM hub, je pH (An *et al.*, 2008). Koncentrace těžkých kovů v půdě také mění společenstvo AM hub (Zarei *et al.*, 2010). Složení společenstva AM hub a jeho diverzita je značným způsobem ovlivňována také typem půdy, ve kterém se nachází. Existují druhy AM hub, které jsou schopné kolonizovat různé typy půdy, ale také druhy specializované, které se vyskytují pouze na určitých půdách (Oehl *et al.*, 2010).

Zemědělství a obdělávání půdy jako komplexní faktor zahrnující mnoho dílčích abiotických faktorů (např. disturbanci, zvýšené obsahy živin) má velký vliv na složení společenstva AM hub. Obecně je pozorován trend, že se zvyšující se intenzitou obhospodařování lokality se snižuje diverzita AM hub. Při úpravě zemědělské půdy orbou dochází ke snižování počtu AM hub (Boddington & Dodd, 2000), a tím i k vymizení některých druhů AM hub. Dochází k selekci více odolných druhů např. z rodu *Glomus*, které se na obhospodařované půdě hojně vyskytují (Jansa *et al.*, 2002). Při zemědělském obhospodařování lokality jsou AM houby vystaveny značnému stresu, který selektuje takové druhy AM hub, které jej dokážou tolerovat (Johnson & Pflieger, 1992).

2.3.2. Vliv biotických faktorů na složení společenstva AM hub

Biotické faktory jako jsou např. hostitelské rostliny a interakce s ostatními organismy mohou mít také velký vliv na složení společenstva AM hub. Obecně je AM symbióza považována za nesespecifickou interakci (Smith & Read, 1997), protože AM houby jsou schopné kolonizovat širokou škálu rostlinných druhů. Některé práce však naznačují, že určitá specifická interakce se mezi AM houbami a jejich hostiteli projevuje. Bylo zjištěno, že společenstva AM hub se liší mezi různými hostitelskými druhy rostlin na jedné lokalitě (Wubet *et al.*, 2006; Sýkorová *et al.*, 2007) a tudíž se vyskytuje jistá preference AM hub pro určité hostitele (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002). Při zvýšené diverzitě hostitelských rostlin se tedy může zvyšovat i diverzita AM hub na lokalitě (Burrows & Pflieger, 2002). Nicméně se zdá, že složení společenstva AM hub je více ovlivňováno půdními podmínkami na lokalitě než hostitelskou rostlinou (Li *et al.*, 2010).

Nejen samotná identita hostitele, ale i rostliny, která s hostitelskou rostlinou sousedí, ovlivňují složení společenstva AM hub v kořenech. V práci Mummey *et al.* (2005) byl zdokumentován výrazný vliv přítomnosti invazní rostliny *Centaurea maculosa* na složení společenstva AM hub v kořenech hostitelského druhu *Dactylis glomerata* a dokonce snížení diverzity AM hub na lokalitě s výskytem *C. maculosa* (Mummey & Rillig, 2006).

Zemědělská praxe radikálně mění původní složení rostlinných druhů na lokalitě na druhy kulturně využívané. Dochází k vytváření monokultur, často i k pěstování nemykotrofních rostlinných druhů např. z čeledi Brassicaceae a tedy i ke změnám ve společenstvu AM hub. To je bezpochyby jedním z důvodů relativně nízké diverzity AM hub na zemědělsky využívaných plochách.

Společenstva AM hub jsou nepochybně ovlivňována i interakcemi s dalšími organismy jako jsou např. bakterie (Vivas *et al.*, 2006) nebo hlístice (Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2009), tyto interakce jsou však jen velmi málo prozkoumané.

2.4. Význam AM hub pro růst rostlin

V AM symbióze dochází k oboustranné výměně látek mezi hostitelem a symbiontem. Rostliny mohou poskytovat svým houbovým symbiontům až 20 % celkového uhlíku, který získávají fotosyntézou (Jakobsen & Rosendahl, 1990). AM houby naopak poskytují rostlinám živiny ve formě minerálních látek (obzvláště fosfor a

dusík, ale i některé mikroprvky jako je kobalt a zinek), mohou zlepšovat jejich odolnost vůči patogenům a regulovat vodní režim rostliny. AM houby mají také velký vliv na biodiverzitu a produktivitu rostlinného společenstva (van der Heijden *et al.*, 1998).

Jednotlivé AM houby se však liší ve vlivu na růst rostlin a také rostliny se mohou lišit v závislosti na mykorhizní symbióze a odpovědi na ni. Vztah mezi rostlinami a AM houbami se tak může pohybovat na škále mezi mutualismem a parazitismem (Johnson *et al.*, 1997).

2.4.1. Závislost a odpověď rostlin na mykorhizu

Mykorhizní závislost rostliny lze definovat jako minimální hladinu fosforu v půdě, při které je již rostlina schopna růst nebo přežít bez mykorhizy. Čím vyšší je tato hladina, tím více je daná rostlina na mykorhize závislá (shrnuto v Janos 2007). Mykorhizní odpověď rostliny je pak rozdíl v růstu mezi rostlinou s mykorhizou a rostlinou bez mykorhizy při určité dostupnosti fosforu (shrnuto v Janos, 2007). Tímto parametrem lze také vyjádřit symbiotickou účinnost jednotlivých mykorhizních hub či jejich společenstev, tedy jejich schopnost podporovat růst rostlin.

Druhy obligátně závislé na mykorhizní symbióze nejsou schopné dokončit životní cyklus při jakékoli úrodnosti půdy, která se vyskytuje v přírodních podmínkách. Přesto mohou tyto druhy rostlin růst bez mykorhizní symbiózy v intenzivně hnojené půdě (Janos, 1980). Méně závislé na mykorhize jsou fakultativně závislé druhy rostlin. Tyto druhy rostlin mohou dosáhnout reprodukčního stádia bez mykorhizní symbiózy alespoň při nejvyšší úrodnosti půdy v přirozených podmínkách (Janos, 1980). Fakultativně závislé rostliny získávají větší prospěch z mykorhizy v půdách s nižší úrodností. Ačkoli většina rostlinných druhů tvoří některý z typů mykorhizní symbiózy, existují i rostliny, které žádnou mykorhizu netvoří - jsou nemykotrofní. Bylo sice pozorováno, že nemykotrofní rostliny mohou mít kořeny kolonizovány mykorhizními houbami, tyto houbové struktury v kořenech však nejsou funkční a rostlina z mykorhizy nemá žádný prospěch (shrnuto v Tester *et al.*, 1987; Rydlová & Vosátka, 2001; Regvar *et al.*, 2003; Püschel *et al.*, 2007a). Typicky nemykotrofními rostlinami jsou např. druhy z čeledí Brassicaceae, Caryophyllaceae a Chenopodiaceae.

Mykorhizní závislost je brána jako neměnná vlastnost konkrétního druhu či genotypu rostliny, kdežto mykorhizní odpověď vychází ze vztahu konkrétní rostliny a mykorhizní houby v určitých podmínkách prostředí. Příslušnost rostliny k funkční (shrnuto v Hoeksema *et al.*, 2010) nebo fylogenetické skupině (Reinhart *et al.*, 2012)

částečně umožňuje předpovědět mykorhizní odpověď rostlinného druhu. Bylo pozorováno, že mykorhizní odpověď rostliny může korelovat s kolonizací jejího kořenového systému mykorhizními houbami (Zangaro *et al.*, 2007). Odpověď rostlin na mykorhizní symbiózu je ale významně ovlivněna také abiotickými faktory jako např. koncentrací fosforu v půdě (Bethlenfalvay *et al.*, 1983), poměrem dusíku a fosforu v půdě (Johnson *et al.*, 2010), suchem (Subramanian *et al.*, 2006) a v experimentálních podmínkách také objemem půdy, který má kořenový systém k dispozici (Zhu *et al.*, 2001). Mykorhizní odpověď může být pozitivní, neutrální nebo záporná. V případě pozitivní odpovědi má rostlina prospěch z mykorhizní interakce, v případě negativní odpovědi rostlině škodí, alespoň měřeno jejím růstem. Při neutrální odpovědi prospěch z mykorhizní symbiózy pouze vyvažuje náklady na ní vynaložené (shrnuto v Janos, 2007).

2.4.2. Vliv identity AM hub na růst rostlin

Růstová odpověď na kolonizaci AM houbami se může lišit v závislosti na tom, kterou konkrétní AM houbou je rostlina kolonizována. Existuje mezidruhová i vnitrodruhová variabilita v účinnosti AM hub. Mezidruhová variabilita byla prokázána například v experimentu McArthur & Knowles (1993a) s lilkem bramborem jako hostitelskou rostlinou, v rozsáhlém experimentu (Klironomos, 2003) s více druhy rostlin nebo v práci Antunes *et al.* (2008). V práci Streitwolf-Engel *et al.* (1997) různé izoláty několika druhů AM hub z rodu *Glomus* různým způsobem ovlivňovaly růst rostlin. Vnitrodruhové rozdíly v účinnosti AM hub ukázala například práce Munkvold *et al.* (2004), kde vnitrodruhová variabilita byla překvapivě větší než variabilita mezidruhová. Vnitrodruhová variabilita v účinnosti AM hub se může projevit i mezi monosporickými izoláty z jedné lokality (Koch *et al.*, 2006).

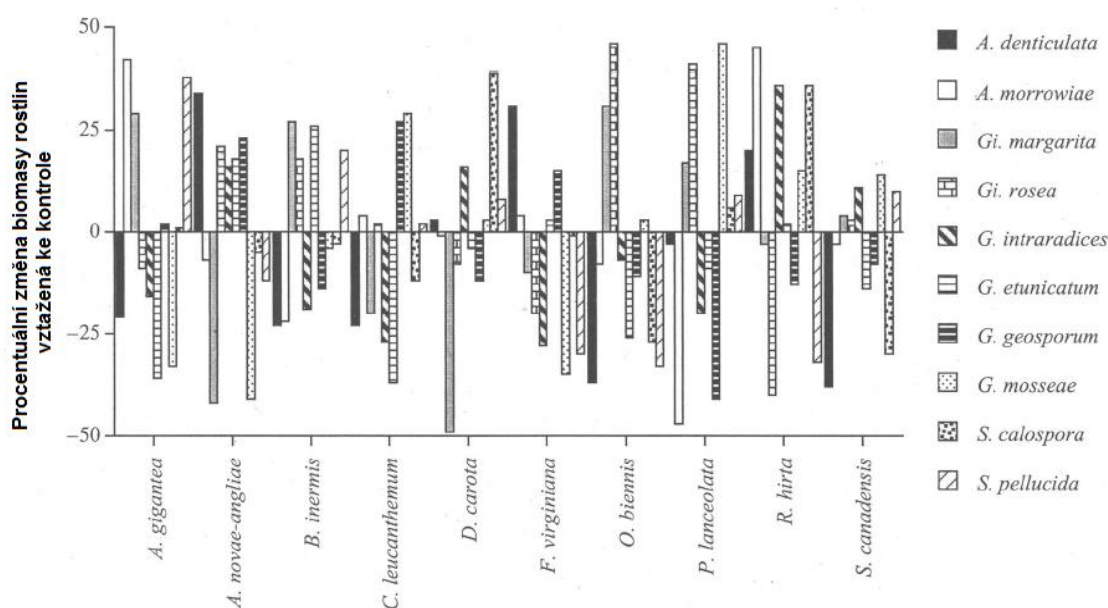
Symbiotická účinnost AM houby může souviset s fenotypovými znaky danými také taxonomickou příslušností. AM houby se mohou lišit například biomasou vnitrokořenového a mimokořenového mycélia a jejich poměrem. Čeleď Gigasporaceae je charakterizována poměrně velkým mimokořenovým mycéliem, naopak čeleď Glomeraceae má poměrně velké mycélium vnitrokořenové. Acaulosporaceae se vyznačuje obecně malým množstvím mycélia vnitrokořenového i mimokořenového (Hart & Reader, 2002). Rozsah a propojenost mimokořenového mycélia se ukazuje jako druhově specifická (Avio *et al.*, 2006). Rozsah mimokořenového mycélia a příjem fosforu spolu mohou korelovat. AM houby se liší v příjmu fosforu jak mezi druhy

(Smith *et al.*, 2000; Lendenmann *et al.*, 2011; Thonar *et al.*, 2011) tak i izoláty jednoho druhu (Munkvold *et al.*, 2004). Je tedy pravděpodobné, že množství fosforu dodaného rostlině závisí na identitě symbiotických AM hub (Avio *et al.*, 2006).

Velikost mycélia může mít vliv na schopnost AM hub poskytovat prospěch rostlině. Větší mycélium může zlepšit přenos živin do rostliny, ale na druhou stranu může odčerpávat od hostitelských rostlin více uhlíku a tím snižovat prospěch z mykorhizy (Harley, 1969). Ukazuje se, že větší mycélium může přispívat k větší biomase rostlin. Také rozsah a poměr mezi vnitrokořenovým a mimokořenovým mycéliem může být důležitý faktor určující prospěch rostlin z mykorhizy. Velikost vnitrokořenového mycélia pro účinnost mykorhizních hub je důležitější než celková velikost mycélia (Hart & Reader, 2002).

Klíčovým faktorem určujícím mykorhizní odpověď rostlin je kombinace konkrétní houby a konkrétní rostliny (Obr. 4) (van der Heijden *et al.*, 1998; Klironomos, 2003). Totožnost mykorhizních hub, které kolonizují kořeny rostlin, může být méně důležitá pro rostliny s nižší mykorhizní odpovědí než pro rostliny vykazující vysokou mykorhizní odpověď (van der Heijden, 2003).

Vliv identity AM hub na mykorhizní odpověď rostlin může být dána také odlišnou symbiotickou účinností konkrétních AM hub v daných podmínkách. Účinnost AM hub může být značně ovlivněna abiotickými faktory, jako jsou např. dostupnost půdního fosforu (Vogelsang *et al.*, 2006) a pH půdy (Hayman & Tavares, 1985).



Obr. 4: Vliv AM hub na růst rostlin. Sloupce představují růstovou mykorhizní odpověď rostlin (*Agrostis gigantea*, *Aster novae-angliae*, *Bromus inermis*,

Chrysanthemum leucanthemum, *Daucus carota*, *Fragaria Virginiina*, *Oenothera biennis*, *Plantago lanceolata*, *Rudbeckia hirta*, *Solidago canadensis*) na konkrétní druhy AM hub (*Acaulospora denticulata*, *Acaulospora morrowiae*, *Gigaspora margarita*, *Gigaspora rosea*, *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus geosporum*, *Glomus mosseae*, *Scutellospora calospora*, *Scutellospora pellucida*) (Převzato a upraveno z Klironomos (2003)).

2.4.3. Vliv společenstva AM hub na růst rostlin

Kolonizace kořenového systému společenstvem AM hub může být pro rostlinu prospěšnější než symbióza pouze s jedním konkrétním taxonem. Různé taxony AM hub se mohou doplňovat a tak rostlině společně prospívat více než každý jednotlivý druh samostatně nebo mohou kompetovat a tím naopak snižovat přínos rostlině (Thonar *et al.*, 2014). Lze předpokládat selekci takových taxonů AM hub, které jsou komplementární vzájemně nebo s daným rostlinným druhem (Koide, 2000).

Druhově bohatší společenstva AM hub mohou lépe podporovat růst rostlin (Sharma *et al.*, 2009). Důležité je však také složení společenstva AM hub v kořenech. Odlišná společenstva AM hub o stejném počtu druhů mohou vyvolat odlišnou růstovou odpověď (Sharma *et al.*, 2009). Růstová odpověď rostlin na mykorhizní symbiózu je dána tedy především identitou AM hub, které kolonizují kořenový systém hostitele, a se zvyšující se druhovou bohatostí AM hub se zvyšuje pravděpodobnost, že se objeví velmi účinný genotyp AM houby pro dané podmínky (Sharma *et al.*, 2009).

Se zvyšující se druhovou bohatostí AM hub však může stoupat i produktivita a diverzita celého rostlinného společenstva. V experimentu van der Heijden *et al.* (1998) se zvyšující se diverzitou AM hub narůstala délka hyf v půdě, klesala koncentrace fosforu v půdě a stoupala koncentrace fosforu v rostlinách. Zvyšovala se efektivnost využití zdrojů a tím i produktivita a biodiverzita rostlin. Vysvětlením může být, že se zvyšující se diverzitou AM hub se spíše objeví účinné specifické kombinace rostlinného hostitele a AM symbionta (van der Heijden *et al.*, 1998). V experimentu Vogelsang *et al.* (2006) diverzita i produktivita rostlinného společenstva rostla s rostoucí druhovou bohatostí inokulovaného společenstva AM hub, avšak při samostatné inokulaci pouze jedním druhem AM houby měly některé druhy podobný účinek na oba parametry jako druhově bohaté inokulum. Je zde tedy patrný výše zmíněný mechanismus výběru nejúčinnějšího izolátu pro celé společenstvo.

2.5. Metody popisu společenstev AM hub

Tradiční přístup identifikace AM hub je založený na morfologii spor a tedy i společenstva AM hub byla dříve popisována výlučně jako společenstva spor. V terénních podmínkách však dochází k degradaci spor, která může znemožňovat identifikaci některých taxonů. Druhy AM hub se navíc liší v intenzitě sporulace (Bever *et al.*, 1996), která nemusí záviset na množství struktur houby v kořenech. Některé houby, které jsou v kořenech rostlin běžné, vůbec nemusí sporulovat (Hempel *et al.*, 2007). Morfologická identifikace AM hub přímo z kořenů rostlin je problematická. Popis společenstev AM hub v kořenech tak umožnily až molekulárně genetické metody, které jsou na morfologii nezávislé (Redecker *et al.*, 2003). S jejich rozvojem bylo navíc zjištěno, že mezi AM houbami existuje vysoká skrytá diverzita, a že velkou část sekvencí AM hub nelze přiřadit k žádným morfologicky popsaným druhům (Sanders *et al.*, 1996).

Pro identifikaci AM hub se často pracuje s tzv. operačními taxonomickými jednotkami (OTU), taxonomickými skupinami vytvořenými na základě určité podobnosti sekvencí. Z důvodu vysoké variability v sekvencích rDNA, absence sexuálních stádií a vysoké skryté diverzity je prakticky nemožné přesně rozlišit druhy AM hub. OTU se proto nemusí shodovat s morfologicky popsanými druhy AM hub, byť je snaha, aby jim jednotlivé OTU odpovídaly, pokud je ovšem pro určitou variantu sekvencí morfologicky popsaný druh k dispozici.

Molekulární metody pro identifikaci AM hub jsou vesměs založeny na namnožení určitých úseků jaderné ribozomální DNA pomocí PCR. Vyskytují se zde vysoce konzervativní i variabilní úseky, které umožňují identifikaci AM hub na různých taxonomických úrovních (Redecker *et al.*, 2003). Nejčastěji se používá oblast malé podjednotky (SSU) jaderné ribozomální DNA, která je nejvíce konzervovaná (Schüssler *et al.*, 2001). Oblast „internal transcribed spacer“ (ITS) se vyznačuje vysokou sekvenční variabilitou a je převážně využívanou oblastí pro identifikaci hub. Pro AM houby se však dnes již často nevyužívá, protože příliš vysoká variabilita znesnadňuje vymezení taxonomických jednotek (Stockinger *et al.*, 2010). Oblast velké podjednotky (LSU) jaderné ribozomální DNA je naopak poměrně často využívána pro molekulární identifikaci AM hub (da Silva *et al.*, 2006), je méně konzervovaná než oblast SSU a naopak méně variabilní než ITS oblast.

Nejčastějším přístupem k identifikaci taxonů AM hub je klonování a poté sekvenování jednotlivých klonů. I v malém kořenovém vzorku se může nacházet více taxonů AM hub (Janoušková *et al.*, 2009), a každý taxon mívá zpravidla více variant sekvencí a proto je nutné sekvenovat mnoho klonů od jednoho vzorku. Tento přístup je finančně i časově náročný a nehodí se pro rozsáhlejší ekologické studie společenstev AM hub (Landis *et al.*, 2004). Nový přístup využívající pyrosekvenaci je sice časově méně náročný (Lumini *et al.*, 2009), ale zůstává problém vysokých nákladů na jeden sekvenovaný vzorek.

Existuje několik molekulárních technik, které umožňují poměrně rychlé a levné charakterizování společenstva v ekosystému bez nutnosti sekvenace, které jsou používány ke sledování diverzity mikrobiálních společenstev. K těmto metodám patří například DGGE - denaturační gradientová gelová elektroforéza (Muyzer *et al.*, 1993), ARISA - automatizovaná analýza ribozomálních ITS sekvencí (Fisher & Triplett, 1999) a T-RFLP - polymorfismus terminálních restrikčních fragmentů (Liu *et al.*, 1997).

2.5.1. Polymorfismus délek terminálních restrikčních fragmentů (T-RFLP)

Metoda T-RFLP sice v poslední době získává velkou konkurenci ve zlevňujících nových sekvenačních přístupech, zůstává však důležitým přístupem pro zpracování velkých počtů vzorků. Mnoho prací, které sledují změny v mikrobiálních společenstvech, tuto metodu využívá. Jedná se hlavně o práce zaměřující se na složení společenstev bakteriálních (Lukow *et al.*, 2000; da C. Jesus *et al.*, 2009; Székely *et al.*, 2009), archeálních (Boyle-Yarwood *et al.*, 2008; De Corte *et al.*, 2009; Vianna *et al.*, 2009) a houbových (Rosling *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Genney *et al.*, 2006). Metoda T-RFLP se používá i při studiu mykorhizních společenstev, jak AM hub (Mummey *et al.*, 2005; Aldrich-Wolfe, 2007; Lekberg *et al.*, 2007), tak ektomykorhizních hub (Dickie *et al.*, 2002; Lindahl *et al.*, 2007). Výhoda této metody spočívá ve schopnosti poměrně rychlé a levné analýzy velkého množství vzorků. V kombinaci s charakterizací společenstva pomocí sekvenace vybraných vzorků navíc umožňuje rovněž identifikaci klíčových druhů (tzv. databázová varianta T-RFLP, viz dále).

Princip metody spočívá v použití fluorescenčně značených primerů v kombinaci s restrikčními enzymy, které štěpí namnožený úsek DNA. Délky takto vzniklých fluorescenčně značených terminálních restrikčních fragmentů (TRF) jsou vizualizovány

v podobě elektroferogramu. Variabilita v délkách těchto fragmentů, potažmo v místech restričního štěpení, odlišuje od sebe jednotlivé taxony ve vzorcích. Existují dvě varianty T-RFLP, „pík“ profilová a databázová (shrnutí v Dickie & FitzJohn, 2007). Tyto dvě varianty jsou založené na stejném postupu zpracování vzorků, ale liší se zpracováním dat a tedy i svými výstupy. „Pík“ profilová varianta porovnává počty „píků“ a jejich profily mezi vzorky, přičemž neidentifikuje konkrétní taxony. Naopak databázová varianta T-RFLP přiřazuje jednotlivé „píky“ (či kombinace „píků“ z různých elektroferogramů) předem vytvořené databázi sekvencí se známými TRF, což umožňuje identifikaci taxonů ve vzorcích.

3. MATERIÁL A METODY:

Diplomová práce se skládá ze dvou částí. Jednou částí je skleníkový nádobový experiment, který sledoval růstovou odezvu vybraných druhů rostlin na odlišná společenstva AM hub z lokality, druhou pak charakterizace diverzity AM hub na lokalitě pomocí analýzy terminálních restričních fragmentů (T-RFLP).

3.1. Popis lokality

Sledovaná lokalita Malešov se nachází v Českém středohoří nedaleko Roudnice nad Labem (50°30'2.627"N, 14°18'57.45"E). Sousedí zde dva typy biotopů - suchý trávník (stráň s přibližně 15% sklonem) a nedávno opuštěné pole (Obr. 5). Podloží na této lokalitě tvoří slín (Studnička, 1972), vegetace patří do svazu Bromion (Ellenberg & Strutt, 1988). Nadmořská výška lokality se pohybuje okolo 194 m n. m. Průměrná roční teplota vzduchu je 7,7 °C a průměrný roční úhrn srážek v regionu je 612 mm (http://www.chmi.cz/portal/dt?portal_lang=cs&menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/). Vybrané chemické vlastnosti půd ukazuje Tabulka 1. Historie této lokality je poměrně komplikovaná a ne zcela dobře zmapovaná. Podle Hemrové & Münzbergové (nepublikováno) bylo v 19. století dnešní opuštěné pole vedeno pouze z 1 / 4 jako pole, zbytek byl les. Stejně tak současný suchý trávník byl v předminulém století pravděpodobně lesem. Les mohl být lesem rozvolněným listnatým s trávníky. Později na počátku 20. století byl na celé lokalitě les přeměněn v pole, stráň však byla pro zemědělství využitelná jen obtížně. V 50. letech 20. století se v důsledku vyvlastnění pozemků hospodaření změnilo. Část pozemků na dnešním suchém trávníku zůstala ležet ladem, přibližně 50% tvořilo pole a 1/6 byla pastvinou. V 80. letech bylo celé dnešní opuštěné pole polem obhospodařovaným. Několik let po převratu v 90. letech přestalo být pole obhospodařováno, stáří současného opuštěného pole se odhaduje na přibližně 20 let.



Obr. 5: Na fotografiích a mapě je schematicky vyznačen současný stav lokality: - suchý trávník (zeleně), - opuštěné pole (hnědě). Zde probíhaly odběry půdy a inokula pro růstový experiment i odběry kořenů pro molekulární analýzu.

	Suchý trávník	Opuštěné pole	Hladina signifikance (hodnoty F)
pH (H ₂ O)	7,60	7,69	** (10,756)
pH (KCl)	7,39	7,41	n. s. (1,368)
N celkový (%)	0,27	0,18	*** (96,458)
C celkový (%)	5,44	2,81	*** (125,560)
C karbonát (%)	3,34	1,73	*** (31,788)
C organické (%)	2,10	1,08	*** (29,848)
Ca extrahovaný (mg kg ⁻¹)	11158,62	8320,24	n. s. (3,581)
Mg extrahovaný (mg kg ⁻¹)	125,82	61,87	*** (85,465)
K extrahovaný (mg kg ⁻¹)	157,51	247,97	*** (84,312)
P dostupný (mg kg ⁻¹)	19,25	23,62	* (4,689)

Tab. 1: Výsledky rozboru půd na obou biotopech z roku 2010. Koncentrace prvků a pH jsou uvedeny jako průměry z deseti opakování, které byly porovnány pomocí jednocestné ANOVA. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. není statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). pH bylo stanoveno v suspenzi půdy v deionizované vodě nebo 0,1 M roztoku KCl. Celkový obsah N, C, organického C, karbonátu, koncentrace extrahovaného Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ a dostupného fosforu byla stanovena za použití metod popsanych v Pánkové *et al.* (2008).

3.2. Skleníkový nádobový experiment

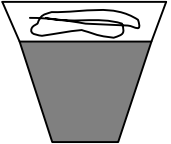

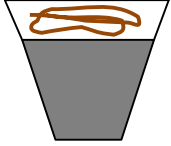
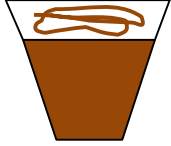
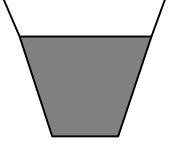
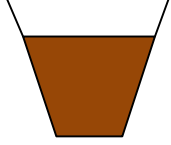
Pro tento experiment bylo vybráno 6 druhů rostlin (Tab. 2), které se vyskytují na lokalitě. Druhy rostlin byly zvoleny tak, aby každé dva druhy tvořily fylogeneticky příbuzný pár, jednalo se tedy o 3 páry rostlin. Rostliny byly vybrány tak, že jedna rostlina z páru roste na suchém trávníku i na opuštěném poli, kdežto druhá rostlina roste pouze na suchém trávníku, opuštěné pole nekolonizuje nebo se na něm objevuje jen sporadicky (Chýlová & Münzbergová, 2008; Knappová *et al.*, 2012; Münzbergová *et al.*, osobní pozorování).

Rostlinný druh:	Čeleď:	Suchý trávník	Opuštěné pole
<i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv. válečka prapořitá	Poaceae	+	+
<i>Briza media</i> L. třeslice prostřední	Poaceae	+	-
<i>Inula salicina</i> L. oman vrbolistý	Asteraceae	+	+
<i>Aster amellus</i> L. hvězdnice chlumní	Asteraceae	+	-
<i>Stachys recta</i> L. čistec přímý	Lamiaceae	+	+
<i>Prunella grandiflora</i> (L.) Scholler černohlávek velkokvětý	Lamiaceae	+	-

Tab. 2: Vybrané druhy rostlin a jejich výskyt v obou biotopech (+ / -).

3.2.1. Popis experimentu

Nádobový experiment byl navržen tak, aby poskytl informace o tom, jak růst rostlin ovlivňují 2 faktory: společenstvo AM hub a půda a jejich případné interakce. Podoba experimentu je schematicky zobrazena v Tab. 3. Půdy byly z obou biotopů odebrány v dubnu 2011 a následně sterilizovány γ zářením (minimálně 26,3 kGy, firma BIOSTER, a.s., Veverská Bítýška). Inokulum v podobě drobných kořenů rostlin se společenstvem AM hub bylo odebráno z obou biotopů v květnu 2011. Pokusné nádoby byly naplněny půdou ze suchého trávníku nebo opuštěného pole a rostliny faktoriálně inokulovány inokulem ze suchého trávníku nebo inokulem z opuštěného pole. Kontrolní rostliny byly ponechány bez inokulace. Vzniklo dohromady 6 variant pokusů (Tab. 3), každá v 10 opakováních. Tímto způsobem bylo pěstováno všech 6 vybraných druhů rostlin, celkový počet pokusných nádob byl tedy 360.

Půda ze suchého trávníku		Půda z opuštěného pole	
	Inokulum ze suchého trávníku		Inokulum ze suchého trávníku
	Inokulum z opuštěného pole		Inokulum z opuštěného pole
	Nemykorhizní kontrola bez inokula		Nemykorhizní kontrola bez inokula

Tab. 3: Schematické zobrazení designu pokusu. Půda a inokulum ze suchého trávníku naznačeny šedě, půda a inokulum z opuštěného pole naznačeny hnědě.

3.2.2. Založení experimentu

Pokus byl založen v květnu 2011. Semena vybraných druhů rostlin byla objednána u firmy Planta Naturalis (Markvartice). K povrchové sterilizaci semen byl použit 10% roztok SAVO Original, do kterého byla semena ponořena na dobu 10 minut. Klíčení semen probíhalo na sterilním písku v počtu přibližně 1000 semen na druh rostliny. Vyklíčené rostliny byly přeneseny do připravených sadbovačů se sterilním pískovým substrátem. Po třech týdnech byly rostliny přemístěny do pokusných nádob

o objemu 1,1 dm³ se sterilním substrátem z lokality, ke kterému bylo přidáno 8 g inokula. Rostliny byly zalaty bakteriálním filtrátem připraveným přefiltrováním suspenze z obou nesterilních půd přes filtrační papír. Vzhledem k faktoriální inokulaci pokusu byly nastaveny stejné podmínky ve všech variantách. Ke kontrolním rostlinám bylo přidáno stejné množství kořenového materiálu sterilizovaného autoklávováním. Rostliny byly zalévány destilovanou vodou. Režim světlo / tma ve skleníku byl nastaven podle přirozené délky dne v daném ročním období. Rostliny, které nebyly sklizeny před započítáním zimního období, byly přemístěny do skleníku bez vyhřívání.

3.2.3. Sklizení experimentu

Sklizení experimentu probíhalo po vykvetení pokusných rostlin za účelem standardizace fáze životního cyklu jednotlivých druhů. Páry rostlin byly sklizeny společně (Tab. 4). Kořeny rostlin byly promyty vodou a zváženy. Část kořenové biomasy byla odebrána na stanovení kolonizace AM houbami (přibližně 2 g) a na molekulární analýzy (přibližně 0,2 g), které nejsou zahrnuty do této diplomové práce. Zbývající kořenová biomasa a biomasa nadzemní byly vysušeny při teplotě 65 °C.

Páry rostlin	Doba sklizně
<i>B. pinnatum</i> <i>B. media</i>	po 13 měsících od přesazení (zazimovány na dobu 4 měsíců)
<i>I. salicina</i> <i>A. amellus</i>	po 11 měsících od přesazení (zazimovány na dobu 4 měsíců)
<i>S. recta</i> <i>P. grandiflora</i>	po 3 měsících od přesazení

Tab. 4: Sklizeně skleníkového nádobového experimentu

3.2.4. Vyhodnocování experimentu

Nadzemní sušina a zbývající kořenová biomasa byly zváženy zvlášť a hodnoty byly zaznamenány. Celková sušina kořenové biomasy byla dopočítána.

Vzorek kořenů pro stanovení kolonizace AM houbami byl nabarven trypanovou modří podle Phillips & Hayman (1970) modifikovanou metodou podle Brundrett *et al.* (1984), aby došlo ke zviditelnění houbových struktur. Kořenový vzorek nastříhaný na velikost přibližně 3 cm byl zalit 10% KOH a ponechán v sušárně při teplotě 90 °C po určitou dobu v závislosti na rostlinném druhu do projasnění kořenů. Poté byl kořenový vzorek promyt tekoucí vodou na jemném sítku. Následovalo okyselení vzorku pomocí 2% kyseliny mléčné. Vzorek byl zahřát na teplotu 90 °C po dobu 20 minut. Po této době byla kyselina vylita a vzorek byl zalit 0,05% roztokem

trypanové modři v laktoglycerolu (1,5 dílu glycerolu : 1 díl 80% kyseliny mléčné : 1,5 dílu ddH₂O) a udržován zahřátý na teplotu 90 °C po dobu 30 minut. Poté byl roztok trypanové modři vodou vymyt a nahrazen čistým laktoglycerolem, ve kterém se vzorky uchovávaly pro další použití.

Kolonizace kořenů AM houbami byla vyhodnocena pomocí Trouvelotovy metody (Trouvelot, 1986). Trouvelotova metoda stanovuje kromě frekvence kolonizace i (semikvantitativně) intenzitu kolonizace a výskyt arbuskulí ve vzorku. Pro vyhodnocení kolonizace ve vzorku bylo použito vždy 30 obarvených segmentů kořene z jednoho kořenového systému. Segmenty byly uzavřeny do glycerolu mezi podložní a krycí sklo. Segmenty byly řazeny do tříd podle zastoupení struktur mykorhizní houby v segmentech (n_0 – žádná kolonizace; n_1 – kolonizováno do 1 % z celkové délky segmentu; n_2 – kolonizováno 1–10 % délky segmentu; n_3 – kolonizováno 10–50 % délky segmentu; n_4 – kolonizováno 50–90 % délky segmentu; n_5 – kolonizováno 90–100 % délky segmentu). Segmenty jsou zároveň řazeny do hladin podle výskytu arbuskulí (A_0 – žádné arbuskule; A_1 – do 10 % délky segmentu; A_2 – 10–50 % délky segmentu; A_3 – 50–100 % délky segmentu).

Frekvence mykorhizních struktur v kořenových segmentech F (%) byla vypočítána jako $F (\%) = 100 (N - n_0) / N$ (kdy N = celkový počet hodnocených segmentů; n_0 = celkový počet nemýkorhizních segmentů). Intenzita kolonizace M (%), která vyjadřuje procento délky kořene kolonizované mykorhizní houbou, a hladina výskytu arbuskulí v celém kořenovém systému A (%), které vyjadřuje procentuální množství kořene s výskytem arbuskulí, byly vypočítány následovně:

- $M (\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / N$, kdy n_5, n_4, n_3, n_2, n_1 = celkový počet mykorhizních segmentů ve třídě n_5, n_4, n_3, n_2, n_1 ; N = celkový počet hodnocených segmentů);

- $A (\%) = aM / 100$ (kdy a = hladina výskytu arbuskulí v jednom segmentu se počítá jako $a = (100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1) / 100$).

Na výpočty byl použit program MycoCalc (<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>). Vyhodnocování kolonizace probíhalo na světelném mikroskopu (Olympus BX60, USA) při 100násobném zvětšení.

Koncentrace fosforu v nadzemní biomase byla stanovena z vysušených a umletých (velikost částic 0,1 mm) nadzemních částí rostlin. Analýza fosforu byla zadána Analytické laboratoři Botanického ústavu AV ČR v Průhonících, kde byla

koncentrace fosforu stanovena metodou podle Olsena (Olsen *et al.*, 1982) za použití UV-Vis spektrometru UV4 (UNICAM).

Z naměřených hodnot (nadzemní suché biomasy, kořenové suché biomasy a z koncentrace fosforu) byla vypočtena mykorhizní odpověď rostlin na daný parametr. Mykorhizní odpověď (MR) byla vypočtena jako $MR (\%) = 100 \times (M - NM) / NM$, kde M je hodnota parametru z jednoho opakování mykorhizní varianty a NM je průměrná hodnota parametru z odpovídající nemykorhizní kontroly. Hodnoty MR se pohybují v intervalu od -100 % do $+\infty$. Pokud MR dosáhne 0 % mykorhizní varianta a nemykorhizní kontrola se neliší v hodnotách parametru. Pokud se MR pohybuje v záporných číslech, má mykorhizní varianta nižší hodnoty tohoto parametru než nemykorhizní kontrola a mykorhizní odpověď je záporná. U hodnoty např. MR = 100 % má mykorhizní varianta dvakrát větší hodnotu daného parametru než nemykorhizní kontrola.

3.2.5. Statistická analýza nádobového experimentu

Pro statistické vyhodnocení nádobového pokusu byl použit program STATISTICA (verze 12, StatSoft Inc., USA). Byla použita metoda faktoriální analýzy rozptylu (ANOVA). Pro stanovení homogenity rozptylu dat byl použit Levenův test (Levene, 1960) homogenity rozptylu a pro určení normálního rozložení dat byl použit Shapiro - Wilkův test normality (Shapiro & Wilk, 1965). Data, která neměla normální rozložení, byla většinou logaritmicky nebo odmocninově transformována. Pro mnohonásobné porovnání rozdílů středních hodnot byl použit multikomparativní Tukeyův HSD test (Meloun & Militký, 2006). Korelace mezi kolonizací kořenů a mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin byla vyhodnocena Pearsonovým korelačním koeficientem.

3.3. T-RFLP analýza společenstev AM hub na lokalitě

Na lokalitě bylo vybráno 12 druhů rostlin (Tab. 5) - 6 taxonomicky příbuzných párů vybraných podle stejných kritérií jako rostliny do pokusu (viz podkapitola 3.2.). Tyto druhy se vyskytovaly na suchém trávníku i na opuštěném poli, nebo pouze na biotopu suchý trávník (Knappová *et al.*, 2012). V červnu a červenci 2010 byly na obou biotopech na lokalitě odebrány kořenové systémy rostlin v květu v počtu 6 - 13 kusů na druh v závislosti na druhu rostliny a biotopu. V případě opuštěného pole byly odebrány pouze ty druhy rostlin, které se na tomto biotopu vyskytují běžně. Kořenové

systemy byly následně v laboratoři promyty, osušeny v kuchyňském papíru, nastříhány na 1 - 2 cm dlouhé segmenty a zhomogenizovány. Z každého kořenového systému byly následně odebrány 1 - 3 vzorky do mikrozkušavek, dle množství materiálu, o 50 - 100 mg čerstvé hmotnosti. Odebrané vzorky kořenů byly uskladněny v mrazicím boxu (Sanyo, Japonsko) při teplotě -80 ° C.

Druh:	Čeleď:	Suchý trávník	Opuštěné pole
		Počet odebraných kořenových systémů	
<i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv. válečka prapořitá	Poaceae	14	11
<i>Briza media</i> L. třeslice prostřední	Poaceae	12	0
<i>Inula salicina</i> L. oman vrbolistý	Asteraceae	11	6
<i>Aster amellus</i> L. hvězdnice chlumní	Asteraceae	6	0
<i>Stachys recta</i> L. čistec přímý	Lamiaceae	7	10
<i>Prunella grandiflora</i> (L.) Scholler černohlávek velkokvětý	Lamiaceae	6	0
<i>Galium verum</i> L. svízel syřišťový	Rubiaceae	6	6
<i>Asperula cynanchica</i> L. mařinka psí	Rubiaceae	6	0
<i>Linum catharticum</i> L. len počistivý	Linaceae	8	12
<i>Linum tenuifolium</i> L. len tenkolistý	Linaceae	10	0
<i>Securigera varia</i> L. čičorka pestrá	Fabaceae	13	8
<i>Anthyllis vulneraria</i> L. úročník bolhoj	Fabaceae	6	0

Tab. 5: Tabulka ukazuje vybrané druhy rostlin pro T-RFLP analýzu AM hub v kořenech s počtem odebraných kořenových systémů na lokalitě.

Obecný metodický postup T-RFLP spočívá nejprve v izolaci DNA ze vzorku, namnožení příslušného úseku DNA pomocí PCR se specifickými fluorescenčně značenými primery, přečištění produktů a následným štěpením restrikcními enzymy. Délky terminálních restrikcčních fragmentů (TRF) se stanovují pomocí kapilárního sekvenátoru a vizualizují v podobě „píků“ na elektroferogramech.

Stanovení společenstev AM hub pomocí metody T-RFLP zahrnuje velké množství časově náročných prací, jak při tvorbě databáze sekvencí, tak při samotné analýze vzorků. S ohledem na množství vzorků nebylo v mých možnostech všechny tyto úkony vykonávat osobně. Proto pro orientaci a přehlednost uvádím souhrnnou tabulku, která zobrazuje konkrétní činnosti a osoby podílejících se na nich (Tab. 6).

Izolace DNA	Mgr. Renata Slavíková (50%) Bc. Alena Voříšková (50%)
Klonování a zpracování sekvencí	Mgr. Renata Slavíková (70%) Bc. Alena Voříšková (30%)
Fylogenetická analýza	Mgr. Renata Slavíková (100%)
Analýza vzorků	Ing. Iveta Jelínková (50%) Bc. Alena Voříšková (30%) Mgr. Renata Slavíková (20%)
Vyhodnocování dat	Bc. Alena Voříšková (100%)

Tab. 6: Souhrnná tabulka zahrnující činnosti a osoby podílejících se na nich (v závorce odhad podílu na celkovém objemu prací).

3.3.1. Extrakce DNA

DNA z kořenů rostlin byla izolována za použití DNeasy Plant Mini kitu (Qiagen, Německo). Mikrozkušavky se vzorky byly ponořeny do tekutého dusíku, zmrzlý vzorek byl vyndán na třecí misku a po přidání tekutého dusíku rozdrčen tloučkem. Dále se postupovalo podle protokolu DNAeasy Plant Mini Kit. Množství a kvalita získané DNA byly ověřeny elektroforézou (podkapitola 3.3.1.1.) na 1% agarózovém gelu. Koncentrace DNA extraktu byla měřena na spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

3.3.1.1. Elektroforéza

Pro ověření kvality získané DNA nebo na zkontrolování PCR produktu byla použita elektroforéza (Sambrook *et al.*, 1989). Byl připraven 1% agarózový gel: 0,28 g agarózy smícháno s 28 ml TAE pufru (1x Tris-acetate-EDTA pufr; 4,84 g Tris base, 1,14 ml kyseliny octové a 2 ml 0,5 M EDTA - kyseliny ethylendiamintetraoctové, doplněno ddH₂O do objemu 1000 ml), po zchlazení na 70 °C byl přidán 1 µl EtBr (ethidium bromid, zásobní roztok 10 mg/ml). Do jamek bylo přidáno 2 µl vzorku v 0,5 µl roztoku brómfenolové modři (6 ml ddH₂O, 5 g sacharózy, Serva, Německo, 0,025 g brómfenolové modři) a 1 µl markeru - λ DNA (Fermentas, Litva) pro ověření izolované DNA; GeneRuler 100 bp (ThermoScientific, USA) pro ověření délky

produktu PCR. Elektroforéza byla zapojena do zdroje napětí na 100 V na 20 minut, následně byl gel vizualizován pomocí UV transiluminátoru.

3.3.2. Tvorba knihovny sekvencí z lokality

Databázová varianta T-RFLP (Dickie & FitzJohn, 2007) vyžaduje vytvoření knihovny sekvencí cílového fragmentu z lokality, ve které se fylogenetickou analýzou vymezí operační taxonomické jednotky (OTU) přítomné na lokalitě a těm se přiřadí určité kombinace délek TRF. Délky TRF vzorků z lokality se pak přiřadí k vytvořeným OTU z knihovny sekvencí, což umožňuje identifikaci taxonů přítomných v daném vzorku.

3.3.2.1. Amplifikace

Z extraktů DNA z 25 vzorků kořenů ze suchého trávníku (*B. media*, *B. pinnatum*, *L. tenuifolium*, *S. recta*) a 28 vzorků z opuštěného pole (*B. pinnatum*, *C. varia*, *G. verum*, *I. salicina*, *L. catharticum*) byla specificky namnožena část velké podjednotky (LSU) jaderné ribozomální DNA (rDNA) AM hub, která obsahuje variabilní domény D1 a D2. Vstupní DNA byla ředěna 1:10. Tato amplifikace probíhala ve dvou krocích podle Krüger *et al.* (2009), avšak ve 2. kroku byl jako přímý použit primer 250fd (Sýkorová *et al.*, 2012) umístěný v konzervovaném úseku LSU, čímž byl získán fragment o délce 550 – 600 bp zahrnující pouze LSU (Tab. 7; Tab. 8). PCR produkty 1. kroku byly do 2. kroku ředěny ddH₂O v poměru 1:100 ddH₂O. Kompletní přehled reakčních směsí PCR 1. a 2. kroku a jednotlivých programů PCR reakcí je uveden v Tabulce 9 a 10. PCR reakce probíhala v termocyklerech (Mastercycler, Mastercycler pro S, Mastercycler gradient, Eppendorf, Německo). Přítomnost a délka produktu PCR byla ověřena elektroforézou na 1% agarózovém gelu po 2. kroku (po 1. kroku zpravidla nebyl produkt na gelu viditelný). Z produktů PCR (od každého 4 µl) byly vytvořeny 4 směsné vzorky na každý biotop (suchý trávník a opuštěné pole).

Primer	Sekvence	Poznámka
SSUmAf1	5'-TGGGTAATCTTTGAAACTTYA-3'	(Krüger <i>et al.</i> , 2009) 1. krok PCR, směs přímých primerů
SSUmAf2	5'-TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA-3'	
LSUmAr1	5'-GTCACACTCAAATCTATCAAA-3'	(Krüger <i>et al.</i> , 2009) 1. krok PCR, směs zpětných primerů
LSUmAr2	5'-GCTCTAACTCAATTCTATCGAT-3'	
LSUmAr3	5'-TGCTTACTCAAATCTATCAAA-3'	
LSUmAr4	5'-GCTTACTCAAACCTATCGA-3'	
250fd	5'-AGTTGTTGGGAWTGCAGCT-3'	(Sýkorová <i>et al.</i> , 2012), modifikovaný 2. krok PCR, přímý primer
LSUmBrY	5'-AACACTCGCAYAYATGTTAGA-3'	(Krüger <i>et al.</i> , 2009), modifikovaný 2. krok PCR, zpětný primer
LSUmBr5	5'- AACACTCGCATATATGCTAGA-3'	
M13F	5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'	(Eurofins MGW Operon, Německo); amplifikace z klonů, přímý primer
M13R	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'	(Eurofins MGW Operon, Německo); amplifikace z klonů, zpětný primer

Tab. 7: Sekvence použitých primerů.

Primer		Objem v reakci
SSU mAf	SSU mAf1 100 µM (Fermentas, Litva)	5 µl
	SSU mAf2 100 µM (Fermentas, Litva)	5 µl
	ddH ₂ O	90 µl
LSU mAr	LSU mAr1 100 µM (Fermentas, Litva)	2,5 µl
	LSU mAr2 100 µM (Fermentas, Litva)	2,5 µl
	LSU mAr3 100 µM (Fermentas, Litva)	2,5 µl
	LSU mAr4 100 µM (Fermentas, Litva)	2,5 µl
	ddH ₂ O	90 µl
250fd	250fd 100 µM (Applied Biosystems, USA)	10 µl
	ddH ₂ O	90 µl
LSU mBrd	LSU mBr 100 µM (Applied Biosystems, USA)	5 µl
	LSU mBr5 100 µM (Applied Biosystems, USA)	5 µl
	ddH ₂ O	90 µl

Tab. 8: Ředění a míchání primerů do PCR reakcí pro získání primeru o koncentraci 10 µM v objemu 100 µl.

	Reakční směs	Objem v reakci
1. krok PCR	ddH ₂ O	10,4 µl
	10x Taq pufr KCL bez MgCl ₂ (Fermentas, Litva)	2 µl
	dNTPs (2mM) (Fermentas, Litva)	2 µl
	MgCl ₂ (25mM) (Fermentas, Litva)	1,6 µl
	Primer LSU mBrd/L (10µM)	1 µl
	Primer 250fd/L (10µM)	1 µl
	BSA (20µg/ µl) (Thermo Scientific, USA)	0,8 µl
	Taq DNA polymeráza rekombinantní (5U/ µl) (Fermentas, Litva)	0,2 µl
	Templát	1 µl
	Celkový objem	20 µl
2. krok PCR	ddH ₂ O	10,4 µl
	10x Taq pufr KCL bez MgCl ₂ (Fermentas, Litva)	2 µl
	dNTPs (2mM) (Fermentas, Litva)	2 µl
	MgCl ₂ (25mM) (Fermentas, Litva)	1,6 µl
	Primer LSU mBrd/L (10µM)	1 µl
	Primer 250fd/L (10µM)	1 µl
	BSA (20µg/ µl) (Thermo Scientific, USA)	0,8 µl
	Taq DNA polymeráza rekombinantní (5U/ µl) (Fermentas, Litva)	0,2 µl
	Templát - 100x ředěný produkt 1. reakce	1 µl
	Celkový objem	20 µl
PCR klonů	H ₂ O	13,6 µl
	PCR pufr bez MgCl ₂ (10x)	2,5 µl
	dNTPs (2mM) (Fermentas, Litva)	1,5 µl
	MgCl ₂ (25mM) (Fermentas, Litva)	1,5 µl
	Primer M13F (10µM)	0,4 µl
	Primer M13R (10µM)	0,4 µl
	Taq DNA polymeráza rekombinantní (5U/ µl) (Fermentas, Litva)	0,1 µl
	Templát	5 µl
	Celkový objem	25 µl

Tab. 9: Reakční směsi pro PCR.

		Teplota	Čas	
1. krok PCR	denaturace	95 °C	5 min	
	denaturace	95 °C	30 s	Počet cyklů 38
	nasedání primerů	60 °C	90 s	
	extenze	72 °C	2 min	
	konečná extenze	72 °C	10 min	
2. krok PCR	denaturace	95 °C	5 min	
	denaturace	95 °C	30 s	Počet cyklů 35
	nasedání primerů	63 °C	90 s	
	extenze	72 °C	2 min	
	konečná extenze	72 °C	30 min	
PCR klonů	denaturace	94 °C	5 min	
	denaturace	94 °C	30 s	Počet cyklů 34
	nasedání primerů	54 °C	30 s	
	extenze	72 °C	1 min	
	konečná extenze	72 °C	10 min	

Tab. 10: Programy PCR reakcí

3.3.2.2. Purifikace

PCR produkty byly přečištěny Zymoclean™ Gel DNA Recovery kitem (Zymo Research Corporation, USA) z 1,5% agarózového gelu. Agarózový gel (o objemu 40 ml) byl připraven z 0,60 g agarózy (Serva, Německo), 40 ml 1x TAE pufru a 2 µl EtBr. 30 µl směsného vzorku bylo nanášeno na gel s přidáním 4 µl BFB. Elektroforéza byla připojena do zdroje o napětí 80 V a proudu 110 mA na 45 minut. Vizualizované produkty PCR reakce byly přímo v UV transiluminátoru vyříznuty skalpelem a přeneseny do mikrozkušavek. Dále se postupovalo podle protokolu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research Corporation, USA). Purifikované produkty byly zkontrolovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu.

3.3.2.3. Klonování

Jako hostitelské buňky pro klonovanou DNA byly využity buňky bakterie *Escherichia coli*. Pro kultivaci bakterií bylo potřeba připravit Petriho misky s pevným LB (Luria - Bertani) médiem. Na přípravu 1000 ml pevného LB média bylo potřeba 10 g tryptonu BactoTryptone (BD, USA), 5 g kvasničního extraktu SERVABacter (Serva, Německo), 10 g NaCl (Penta, ČR), 15 g agaru (Serva, Německo), ddH₂O byla doplněna do zbývajících objemu 1000 ml. Médium se rozvařilo a sterilizovalo.

Po vychladnutí na 60° C bylo do média přidáno 2000 µl ampicilinu (50 mg/ml ddH₂O; Sigma - Aldrich, USA), 800 µl X-galu (5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid; 100 mg / ml v dimethylformamidu, Promega, USA); a 1000 µl IPTG (izopropylthio-β-galaktosid; 100 mM, Sigma-Aldrich, USA). LB médium bylo rozlito ve flow-boxu do Petriho misek.

Klonování PCR produktů proběhlo za využití protokolu pGEM-T Vector Systems (Promega, USA). Fragment obsahující zkoumanou sekvenci byl ligovaný do plasmidu pGEM - T Vektor pomocí T4 DNA ligázy. Množství vkládaného inzertu bylo vypočítáno vzorcem: $množství\ PCR\ produktu\ (ng) = [(délka\ inzertu\ (kb) / délka\ vektoru\ (kb)] * 50\ množství\ vektoru\ (ng)$. Mezi molárním poměrem vkládaného inzertu a vektoru byl použit poměr 2 : 1. Objem PCR produktu (x) do ligační reakce byl přepočítán z koncentrace konkrétního vzorku. Mikrozkušavky s ligační směsí (Tab. 11) byly inkubovány přes noc při 4 °C.

Na jednu ligační reakci	Standardní reakce	Pozitivní kontrola
2XRapid ligační pufr	5 µl	5 µl
pGEM-T Vektor (50ng) (velikost vektoru 3000bp)	1 µl	1 µl
PCR produkt	x µl	
Kontrolní inzertní DNA		2 µl
T4 DNA Ligáza (3 Weiss jednotky)	1 µl	1 µl
doplnění ddH ₂ O do celkového objemu 10 µl		

Tab. 11: Složení ligační směsi pro klonování.

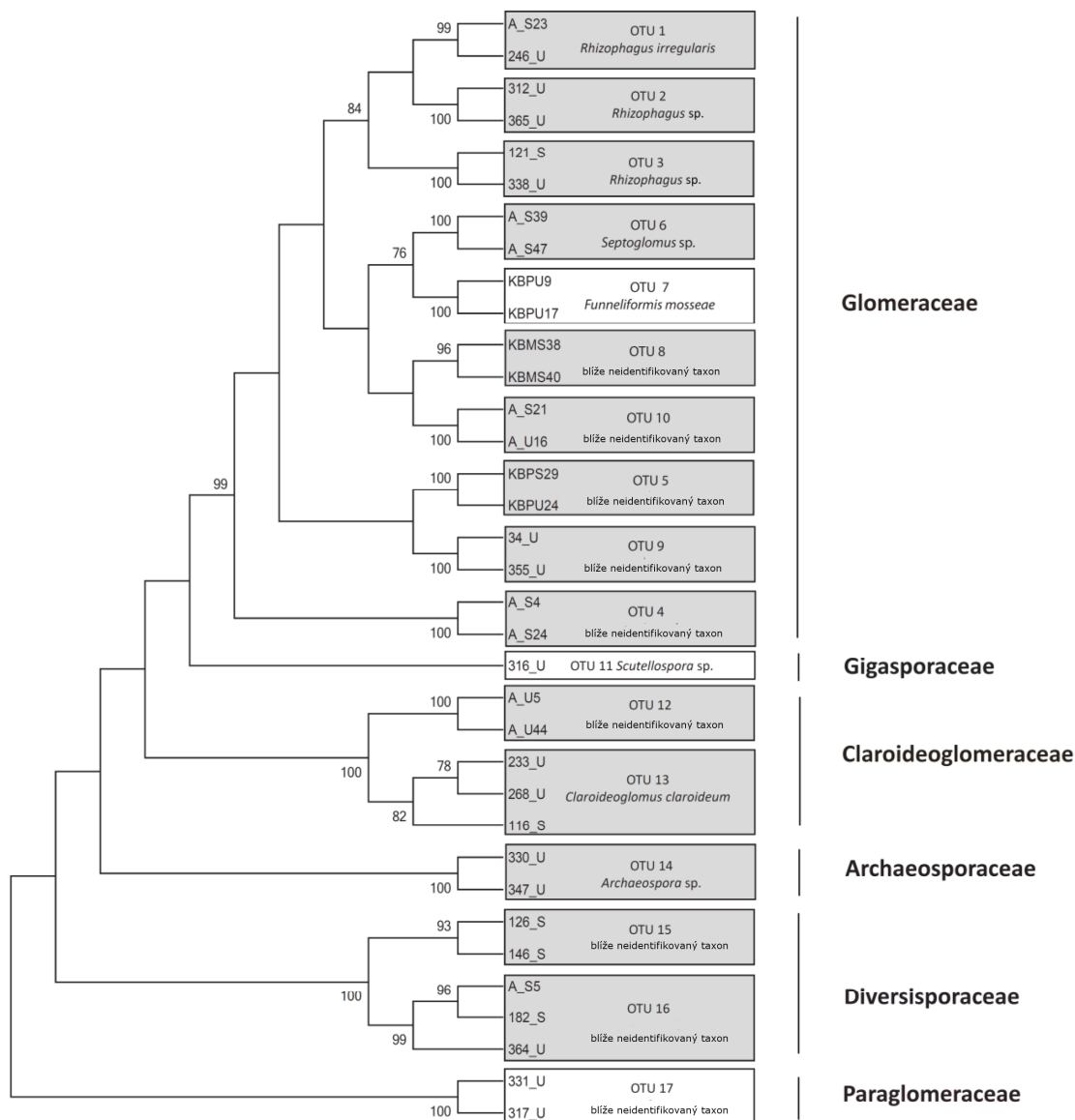
Transformace buněk JM109 (Promega, USA) probíhala následujícím postupem: 25 µl rozmražených buněk bylo smícháno s 2 µl ligační směsí a inkubováno 20 minut na ledu. Poté byly mikrozkušavky s buňkami ponořeny na 50 sekund do vodní lázně s teplotou 42 °C a neprodleně přeneseny na dvě minuty na led. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 475 µl SOC média (Super Optimal Broth pro katabolickou represi, Invitrogene, USA), s kterým byly mikrozkušavky inkubovány za stálého třepání (150 rpm) 1,5 hod ve 37 °C. 100 µl suspenze buněk bylo rozetřeno na Petriho misce a inkubováno přes noc ve 37 °C. Bíle zbarvené kolonie byly resuspendovány ve 20 µl ddH₂O a denaturovány při teplotě 95 °C 10 minut pro následnou amplifikaci inzertu. Zároveň byly očíslovány a přeneseny na další Petriho misky s LB médiem a inkubovány přes noc při 37 °C. Amplifikace inzertů z klonů

proběhla podle reakčních směsí a programu jednotlivých PCR reakcí za použití primerů M13F a M13R nasedajících na vektor (Tab. 7; Tab. 9; Tab. 10). PCR produkty byly zkontrolovány elektroforeticky na 1% agarózovém gelu a zaslány (v počtu 192 na biotop suchý trávník a 216 na opuštěné pole) na sekvenaci (Sanger & Nicklen, 1977) do firmy Macrogen (Jižní Korea).

Z klonů zastupující různé délky TRF, byly připraveny glycerolové konzervy. Konkrétní bakteriální kolonie byla odebrána z Petriho misky a dána do zkumavky s 3 ml tekutého LB média (bez přídavku agaru), do kterého byly přidány 3 μ l ampicilinu. Zkumavky byly inkubovány přes noc na třepačce. 850 μ l bakteriální kultury bylo napipetováno do mikrozskumavek a přidáno 150 μ l 87% glycerolu. Glycerolové konzervy byly zamrazeny a skladovány při teplotě -70 °C.

3.3.2.4. Úprava sekvencí a konstrukce fylogenetického stromu

Sekvence klonů byly zobrazeny v programu Chromas Lite 2.1.1. (Technelysium Pty Ltd., Austrálie), špatné sekvence byly vyřazeny. Další úprava sekvencí proběhla v programu BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999), kde byly sekvence ořezány na fragment ohraničený použitými primery (250fd a LSU mBrd). Sekvence byly testovány na příslušnost ke skupině Glomeromycota softwarem BLAST (Altschul *et al.*, 1997). V programu MAFFT (verze 6, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) byl ze sekvencí vytvořen alignment s penaltou za otevření mezery 1,0. Chybějící data byla ošetřena vyloučením nukleotidových pozic, které měly nižší pokrytí než 15 %. Fylogenetická analýza byla vypracována v programu Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) distanční analýzou metodou Neighbour-joining se stanovením spolehlivosti za využití neparametrické techniky opakovaného výběru „bootstrapping“ s 1000 opakováními a substitučního modelu Kimura. Metodou outgroup za použití taxonu Paraglomeraceae byl vytvořen zakořeněný fylogenetický strom. Nomenklatura použitá při tvorbě fylogenetického stromu byla převzata z <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/> a Krüger *et al.* (2012). Na základě této fylogenetické analýzy bylo vymezeno 17 OTU. Nalezené OTU byly zastoupeny v šesti čeledích (Glomeraceae, Gigasporaceae, Claroideoglomeraceae, Archaeosporaceae, Diversisporaceae, Paraglomeraceae) kmene Glomeromycota (Obr. 6). Konstrukci fylogenetického stromu zpracovávala Mgr. Renata Slavíková.



Obr. 6: Schematický fylogenetický strom vytvořený z databáze sekvencí AM hub na lokalitě. Každé OTU je reprezentována pouze dvěma až třemi vybranými sekvencemi z lokality. Šedé rámečky znázorňují OTU, které byly nalezené v kořenových vzorcích, bílé rámečky znázorňují OTU, které nebyly nalezeny v kořenových vzorcích metodou T-RFLP.

3.3.3. Analýza vzorků pomocí T-RFLP

Pro analýzu vybraných vzorků z lokality byla použita metoda, která je podrobněji popsána v následující podkapitole Analýza kořenových vzorků z lokality. Pro analýzu každého vzorku byly využity 4 elektroferogramy - přední a zadní TRF (rozeznatelné délky použitým fluorescenčně značeným primerům) štěpené odděleně dvěma restrikcčními enzymy MboI (rozeznává sekvenci 5'...[^]GATC...[']3) a TaqI (rozeznává sekvenci 5'...T[^]CGA...[']3).

3.3.3.1. Analýza kořenových vzorků z lokality

DNA extrahovaná z 52 vzorků ze suchého trávníku a 25 vzorků z opuštěného pole (Příloha 1) z lokality byla specificky namnožena dvoukrokou (nested) PCR. Vstupní DNA byla ředěna 1:10. V prvním kroku byly použity primery SSU mAf a LSU mAr, ve druhém kroku fluorescenčně značené primery VIC - 250fd a 6 - FAM - LSU mBrd (VIC - 4,7,2'-trichloro-7'-fenylo-6-karboxyfluorescein a 6 - FAM (6-karboxyfluorecein) (Tab. 7). Podmínky PCR reakcí jsou uvedeny v Tabulce 10. Každý vzorek byl amplifikován v triplicátu (ve 3 oddělených reakcích). Mezi prvním a druhým krokem PCR byly produkty ředěny 1 : 100 ddH₂O. Výsledné produkty byly zkontrolovány za použití elektroforézy. Z každé ze tří PCR reakcí bylo přeneseno do jedné mikrokumavky 10 µl PCR produktu a byly přidány 4 µl BFB. PCR produkt byl přečištěn ZymocleanTM Gel DNA Recovery kitem (Zymo Research Corporation, USA) z 1,5% agarózového gelu. Purifikace PCR produktů byla ověřena elektroforézou.

Purifikovaný produkt byl rozdělen na dvě poloviny a naštěpen v oddělených reakcích oběma restrikčními enzymy. Pro každý z enzymů byla připravena reakční směs (Tab. 12). 8 µl směsi jednoho enzymu bylo přidáno k 8 µl produktu. Směs s enzymem MboI byla inkubována v termocykleru 12 hodin při teplotě 37 °C a 20 minut při teplotě 65 °C, směs s enzymem TaqI 12 hodin při teplotě 65 °C.

Enzym Mbol	Objem v reakci	Enzym TaqI	Objem v reakci
Mbol (10U/ µl) (MBI Fermentas, Litva)	0,29 µl	TaqI (10U/ µl) (MBI Fermentas, Litva)	0,29 µl
10x Pufr R ⁺ (MBI Fermentas, Litva)	1,6 µl	10x Pufr TaqI ⁺ (MBI Fermentas, Litva)	1,6 µl
ddH ₂ O	6,11 µl	ddH ₂ O	6,11 µl

Tab. 12: Reakční směsi pro 1 reakci restrikčního štěpení

Vzorky byly po ukončení reakce zchlazeny na ledu a ředěny 1:20. Pro přípravu na fragmentační analýzu bylo ke 2 µl každého vzorku přimícháno 8 µl deionizovaného formamidu a 0,25 µl standardu GeneScanTM 600 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems, USA). Analýza vzorků proběhla v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK na kapilárním sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Každý vzorek byl analyzován ve dvou nezávislých opakováních počínaje amplifikací cílového fragmentu v triplikátech.

3.3.3.2. Faktická versus pozorovaná délka TRF

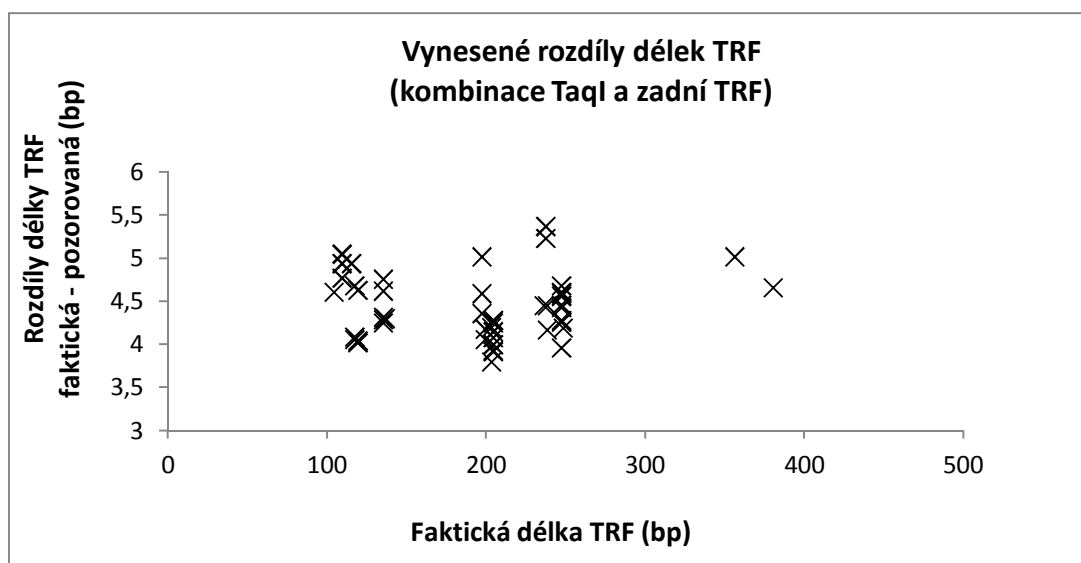
Všechny sekvence z databáze sekvencí z lokality byly podrobeny virtuálnímu štěpení enzymy MBoI a TaqI v programu CLC Sequence View 6.8.1 (CLC bio, Dánsko).

Faktická délka TRF získaná virtuálním štěpení sekvencí klonů se však od délky získané z kapilárního sekvenátoru může lišit až o několik párů bazí. Rozdíl mezi faktickou a pozorovanou délkou fragmentu je způsoben charakteristikami štěpeného fragmentu jako tvorbou sekundárních struktur, zastoupením G + C (guanin a cytosin) nukleotidových párů (Bukovská *et al.*, 2010), délkou fragmentu, nebo mírnými rozdíly v molekulární váze způsobené obsahem purinů a fluorescenčním značením fragmentu (Kaplan & Kitts, 2003). Aby data z elektroferogramů byla porovnatelná s daty z databáze sekvencí, bylo nutné zjistit rozdíl mezi faktickou a pozorovanou délkou TRF.

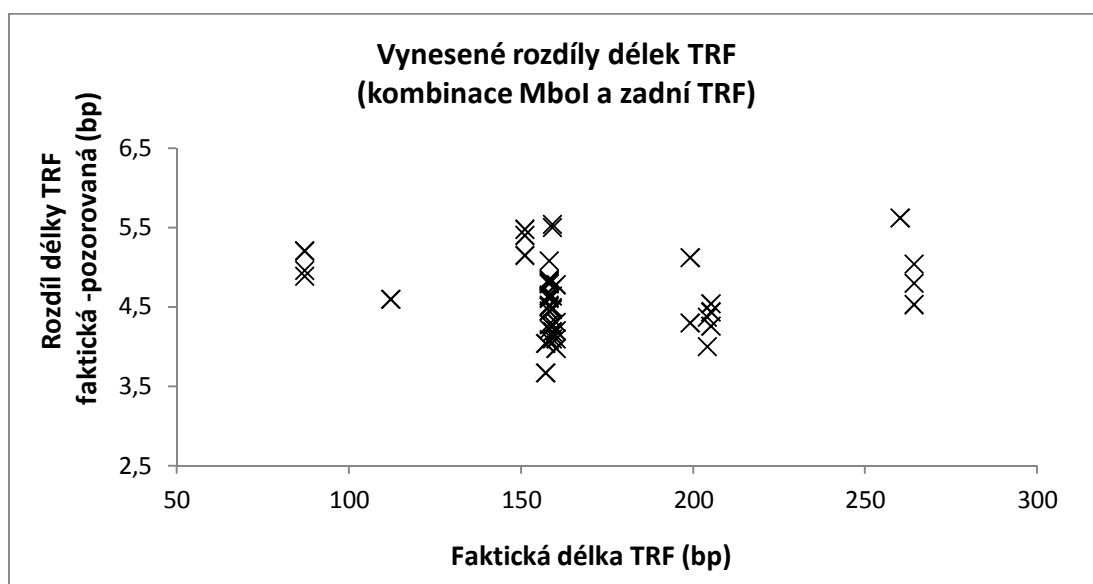
Bylo vybráno celkem 30 klonů, které zastupují různé délky TRF získané virtuálním štěpení databáze sekvencí. Tyto klony byly oživeny ze zamražených glycerolových konzerv a byla u nich provedena analýza T-RFLP (viz podkapitola 3.3.3.1.)

Z pozorované délky TRF fragmentů o známé faktické délce byl následně vypočítán posun mezi faktickou a pozorovanou délkou TRF. Vynesení rozdílů délek TRF do grafů pro každou kombinaci enzymu a předního / zadního TRF ukázalo, že přední fluorescenční sonda (VIC) více ovlivňovala migraci kratších fragmentů (Obr. 9, Obr. 10), zatímco zadní fluorescenční sonda (6 - FAM) ovlivňovala migraci fragmentů nezávisle na jejich délce (Obr. 7, Obr. 8). Tato data posloužila k výpočtu posunu mezi faktickou a pozorovanou délkou, tzn. pro výpočet rozsahu pozorované délky fragmentu, kterou lze očekávat pro každou faktickou délku fragmentu. Tento výpočet byl proveden pro každou kombinaci enzymu a předního / zadního TRF zvlášť.

Výpočet rozdílu pro obě kombinace enzym – zadní TRF (Obr. 7, Obr. 8) byl následující: ze zaznamenaných rozdílů délky TRF faktické a TRF pozorované byl určen nejmenší (3,67 bp pro enzym MboI a 3,80 bp pro enzym TaqI) a největší (5,62 bp pro enzym MboI a 5,37 bp pro enzym TaqI) posun mezi těmito délkami. Od délky TRF faktické byl odečten nejmenší posun a největší posun a tím získáno rozpětí délky, ve kterém lze očekávat pozorovanou délku TRF.



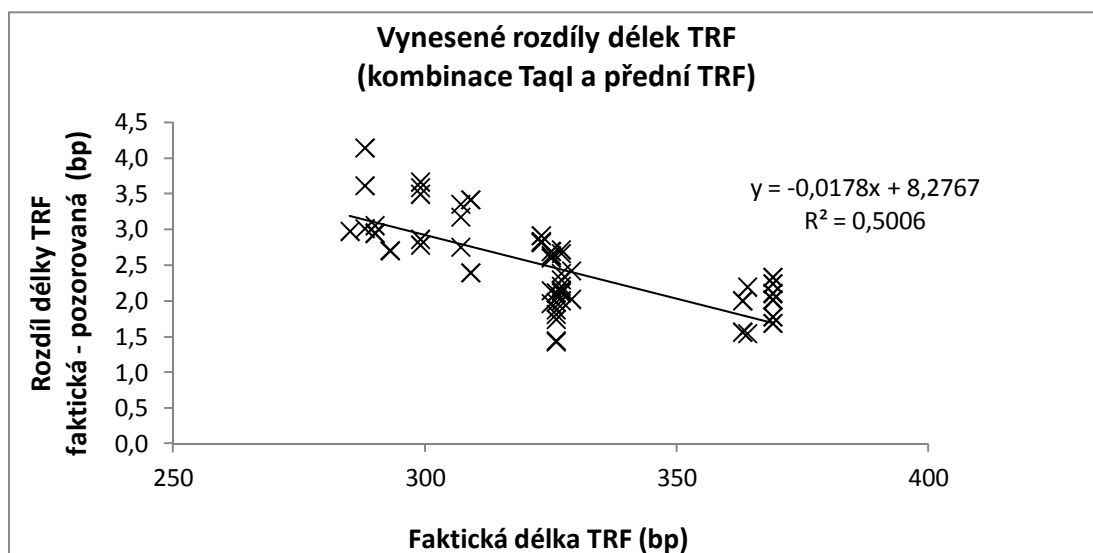
Obr. 7: Vynesené rozdíly pozorovaných a faktických délek TRF u vybraných sekvencí z databáze při kombinaci enzymu TaqI a zadního TRF.



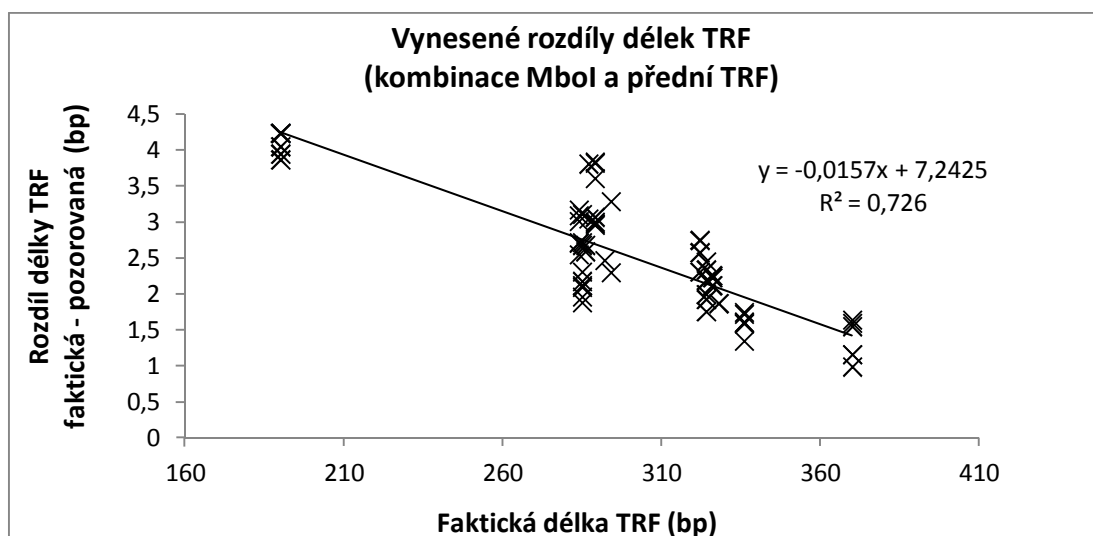
Obr. 8: Vynesené rozdíly pozorovaných a faktických délek TRF u vybraných sekvencí z databáze při kombinaci enzymu MboI a zadního TRF.

Výpočet rozdílu pro obě kombinace enzym - přední TRF byl následovný: z grafu byla metodou lineární regrese určena rovnice regresní přímky ($y = ax + b$), kdy y je rozdíl mezi faktickou a pozorovanou délkou pro každou faktickou délkou TRF x . Od všech faktických délek v databázi byl odečten posun daný regresní přímkou. Dále byla spočítána vzdálenost jednotlivých bodů (pozorovaných rozdílů v délkách TRF, viz Obr. 9 a 10) od regresní přímky pomocí vzorce $v = \frac{|ax_a + by_a + c|}{\sqrt{a^2 + b^2}}$ a byly určeny maximální vzdálenosti bodů od přímky (směrem nahoru a dolů). Rozpětí mezi nimi

určuje šířku intervalu daného náhodnou variabilitou, v kterém lze očekávat pozorované délky pro určitou faktickou délku TRF. Tyto maximální vzdálenosti pak byly přičteny (směrem nahoru) a odečteny (směrem dolů) od posunu spočítaného pomocí regresní přímky a vznikl tak interval, v kterém lze očekávat pozorované délky pro každou faktickou délku fragmentu.



Obr. 9: Vynesené rozdíly pozorovaných a faktických délek TRF u vybraných sekvencí z databáze při kombinaci enzymu TaqI a předního TRF.



Obr. 10: Vynesené rozdíly pozorovaných a faktických délek TRF u vybraných sekvencí z databáze při kombinaci enzymu MboI a předního TRF.

Pro neštěpené sekvence nesoucí obě fluorescenční barviva, bylo na základě pozorování „píků“ v elektroferogramech určeno specifické rozpětí, ve kterém se pohybuje neštěpená délka sekvence. Výsledná rozpětí pro každou kombinaci enzymu a

přední / zadní TRF byla zadána do programu GeneMapper, používaného pro zpracování dat z elektroferogramů (viz kapitola 3.3.4) jako takzvané "biny".

3.3.3.3. OTU spadající do vymezených rozsahů délek TRF

Jednotlivým OTU byly na základě sekvencí z databáze přiřazeny faktické délky TRF a odpovídající rozpětí pozorovaných délek. Každé OTU bylo tedy charakterizováno čtyřmi rozpětími délek pro každou kombinaci enzymu a předního / zadního TRF (Tab. 13). Většině OTU však bylo, díky variabilitě sekvencí v rámci OTU přiřazeno více rozpětí délek pro každou kombinaci enzymu a TRF. Tato rozpětí přiřazená k jednotlivým OTU byla základem pro rozlišení a identifikaci taxonů AM hub z kořenových vzorků (viz podkapitola 3.3.4.).

Kombinace rozpětí délek TRF, ve kterých se vyskytují pozorované délky TRF přiřazené k jednotlivým OTU				
	Mbol +přední TRF	Mbol + zadní TRF	TaqI + přední TRF	TaqI + zadní TRF
OTU 1	191,90 - 195,58	142,38 - 147,33	315,88 - 329,07	95,63 - 105,20
	318,86 - 330,03	97,38 - 99,33	315,88 - 329,07	95,63 - 105,20
	318,86 - 330,03	102,38 - 108,33	315,88 - 329,07	53,63 - 55,20
	318,86 - 330,03	142,38 - 147,33	315,88 - 329,07	60,63 - 62, 20
	318,86 - 330,03	142,38 - 147,33	315,88 - 329,07	95,63 - 105,20
	318,86 - 330,03	142,38 - 147,33	315,88 - 329,07	197,63 - 200,20
	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	102,58 - 105,62	95,63 - 105,20
	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	315,88 - 329,07	95,63 - 105,20
	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	315,88 - 329,07	240,63 - 245,20
	318,86 - 330,03	198,38 - 201,33	315,88 - 329,07	95,63 - 105,20
	360,51 - 369,64	142,38 - 147,33	315,88 - 329,07	95,63 - 105,20
	360,51 - 369,64	150,38 - 156,33	461,12 - 463,15	95,63 - 105,20
	OTU 2	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	333,14 - 335,17
318,86 - 330,03		150,38 - 156,33	333,14 - 335,17	230,63 - 237,20
OTU 3	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	184,85 - 187,89	373,63 - 377,20
	360,51 - 369,64	150,38 - 156,33	184,85 - 187,89	350,63 - 353,20
	360,51 - 369,64	150,38 - 156,33	184,85 - 187,89	373,63 - 377,20
	360,51 - 369,64	198,38 - 201,33	184,85 - 187,89	373,63 - 377,20
	360,51 - 369,64	150,38 - 156,33	184,85 - 187,89	384,63 - 386,20
OTU 4	356,44 - 358,47	113,38 - 116,33	355,49 - 357,51	144,63 - 146,20
OTU 5	281,28 - 292,45	192,38 - 196,33	315,88 - 329,07	190,63 - 195,20
	281,28 - 292,45	192,38 - 196,33	279,31 - 296,57	190,63 - 195,20
	281,28 - 292,45	258,38 - 261,33	279,31 - 296,57	240,63 - 245,20
	294,49 - 297,53	192,38 - 196,33	279,31 - 296,57	129,63 - 133,20
	294,49 - 297,53	258,38 - 261,33	279,31 - 296,57	129,63 - 133,20
OTU 6	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	279,31 - 296,57	108,63 - 116,20
	318,86 - 330,03	150,38 - 156,33	279,31 - 296,57	190,63 - 195,20
OTU 7	242,69 - 244,71	150,38 - 156,33	315,88 - 329,07	240,63 - 245,20
OTU 8	91,90 - 195,96	150,38 - 156,33	315,88 - 329,07	230,63 - 237,20

OTU 9	281,28 - 292,45	113,38 - 116,33	184,85 - 187,89	108,63 - 116,20
	281,28 - 292,45	192,38 - 196,33	279,31 - 296,57	108,63 - 116,20
	281,28 - 292,45	192,38 - 196,33	184,85 - 187,89	190,63 - 195,20
	281,28 - 292,45	192,38 - 196,33	279,31 - 296,57	190,63 - 195,20
OTU 10	281,28 - 292,45	198,38 - 201,33	184,85 - 187,89	197,63 - 200,20
	281,28 - 292,45	198,38 - 201,33	279,31 - 296,57	197,63 - 200,20
	281,28 - 292,45	150,38 - 156,33	279,31 - 296,57	240,63 - 245,20
	303,63 - 308,70	258,38 - 261,33	184,85 - 187,89	197,63 - 200,20
	303,63 - 308,70	258,38 - 261,33	279,31 - 296,57	197,63 - 200,20
	303,63 - 308,70	258,38 - 261,33	279,31 - 296,57	230,63 - 237,20
	303,63 - 308,70	239,38 - 241,33	184,85 - 187,89	240,63 - 245,20
	318,86 - 330,03	198,38 - 201,33	315,88 - 329,07	197,63 - 200,20
	318,86 - 330,03	198,38 - 201,33	367,68 - 372,75	197,63 - 200,20
	318,86 - 330,03	239,38 - 241,33	315,88 - 329,07	240,63 - 245,20
	318,86 - 330,03	239,38 - 241,33	550,03 - 556,75	570,03 - 577,75
	318,86 - 330,03	239,38 - 241,33	570,03 - 577,75	570,03 - 577,75
	554,55 - 572,39	554,55 - 572,39	279,31 - 296,57	230,63 - 237,20
	554,55 - 572,39	554,55 - 572,39	184,85 - 187,89	240,63 - 245,20
554,55 - 572,39	554,55 - 572,39	279,31 - 296,57	240,63 - 245,20	
554,55 - 572,39	554,55 - 572,39	315,88 - 329,07	240,63 - 245,20	
554,55 - 572,39	554,55 - 572,39	176,73 - 178,75	271,63 - 277,20	
OTU 11	318,86 - 330,03	131,38 - 133,33	246,81 - 248,83	271,63 - 277,20
OTU 12	173,62 - 175,64	102,38 - 108,33	215,32 - 218,36	271,63 - 277,20
	191,90 - 195,96	102,38 - 108,33	180,79 - 183,83	95,63 - 105,20
	191,90 - 195,96	268,38 - 270,33	180,79 - 183,83	95,63 - 105,20
	191,90 - 195,96	102,38 - 108,33	279,31 - 296,57	95,63 - 105,20
	191,90 - 195,96	102,38 - 108,33	279,31 - 296,57	271,63 - 277,20
	281,28 - 292,45	102,38 - 108,33	267,12 - 269,15	95,63 - 105,20
	281,28 - 292,45	102,38 - 108,33	251,89 - 253,91	95,63 - 105,20
	281,28 - 292,45	102,38 - 108,33	279,31 - 296,57	95,63 - 105,20
	281,28 - 292,45	268,38 - 270,33	279,31 - 296,57	95,63 - 105,20
	281,28 - 292,45	102,38 - 108,33	279,31 - 296,57	95,63 - 105,20
	294,49 - 297,53	102,38 - 108,33	279,31 - 296,57	95,63 - 105,20
OTU 13	191,90 - 195,96	320,38 - 322,33	188,92 - 190,94	271,63 - 277,20
	191,90 - 195,96	360,38 - 362,33	188,92 - 190,94	271,63 - 277,20
	191,90 - 195,96	320,38 - 322,33	279,31 - 296,57	271,63 - 277,20
	554,55 - 572,39	554,55 - 572,39	279,31 - 296,57	271,63 - 277,20
	234,56 - 236,58	320,38 - 322,33	279,31 - 296,57	271,63 - 277,20
OTU 14	356,44 - 358,47	113,38 - 116,33	355,49 - 357,51	144,63 - 146,20
OTU 15	360,51 - 369,64	192,38 - 196,33	279,31 - 296,57	190,63 - 195,20
OTU 16	360,51 - 369,64	81,38 - 83,33	279,31 - 296,57	108,63 - 116,20
	360,51 - 369,64	81,38 - 83,33	180,79 - 183,83	190,63 - 195,20
	360,51 - 369,64	150,38 - 156,33	279,31 - 296,57	190,63 - 195,20
	360,51 - 369,64	81,38 - 83,33	279,31 - 296,57	190,63 - 195,20
	471,22 - 473,24	77,38 - 79,33	215,32 - 218,36	108,63 - 116,20
OTU 17	519,97 - 522,00	514,38 - 516,33	378,85 - 380,87	129,63 - 133,20

Tab. 13: Shrnutí všech rozpětí délek TRF, ve kterých se pohybuje pozorovaná délka TRF. Jednotlivé OTU jsou přiřazeny ke kombinaci vždy 4 konkrétních rozpětí délek TRF (pro oba enzymy + přední / zadní TRF) a těchto kombinací může být pro jednotlivé OTU více.

3.3.4. Zpracování a vyhodnocování dat

Ke zpracování dat byl použit program GeneMapper[®] Software (Applied Biosystems, USA). Pro analýzu každého vzorku byly využity 4 elektroferogramy (přední a zadní TRF po oddělení dvěma restrikčními enzymy). Podle tabulek v Příloze 2 a 3 byl v programu vytvořen soubor "binů" pro každou kombinaci enzym – TRF (přední / zadní), tzn. celkem 4 soubory "binů". Tyto soubory „binů“ sloužily k automatickému vytvoření matice přítomnosti či nepřítomnosti „píků“ v těchto délkových intervalech v režimu analýzy "AFLP". „Píky“ nacházející se mimo „biny“ nebyly brány v potaz.

Elektroferogramy, které obsahovaly „píky“ v rozmezí intenzity 100 - 10 000 RFU byly zahrnuty do analýzy. Vzorky, které nesplňovaly tuto podmínku, byly připraveny znovu. Nastavení programu pro převedení „píků“ do matice bylo následovné: normalizační algoritmus byl nastaven na celkovou sumu signálu, normalizace probíhala zároveň v celém projektu, detekční limit pro detekci a zaznamenání přítomnosti „píku“ v "binu" byl nastaven na 25 RFU, jako velikostní standard byl vybrán LIZ 600, soubor "binů" byl nastaven podle toho, jaká kombinace enzym - TRF (přední / zadní) se právě analyzovala, dále bylo ponecháno defaultní nastavení. Ve výsledné matici byl výskyt alespoň jednoho „píku“ v "binu" kódován jako 1, absence „píku“ v "binu" jako 0. Všech 52 vzorků ze suchého trávníku a 25 vzorků z opuštěného pole, každý ve dvou nezávislých stanoveních, bylo analyzováno současně v jednom projektu.

Pro další vyhodnocení pak byla sloučena data z obou nezávislých stanovení na vzorek tak, že byla brána v úvahu společná množina „binů“ s kódem 1 v obou vzorcích. Následné vyhodnocování dat proběhlo v programu R 3.0.2. (<http://www.R-project.org>) v balíčku TRAMPR 1.0-7 (Fitzjohn & Dickie, 2007). Zde se postupovalo podle manuálu z webových stránek programu (<http://cran.r-project.org/web/packages/TRAMPR/index.html>). Nejprve byla vytvořena databáze OTU s přiřazenými velikostmi TRF (4 rozměry – přední / zadní TRF a dva enzymy). Na základě podobnosti ve všech 4 rozměrech délek TRF byly následně přiřazeny odpovídající délky TRF ze vzorků. Tímto způsobem byla vytvořena matice přítomnosti nebo nepřítomnosti OTU ve vzorku.

3.3.5. Statistická analýza T-RFLP

Data o druhové bohatosti byla zpracována jednocestnou a faktoriální analýzou variance (ANOVA). Na určení homogenity rozptylu byl použit Levenův test

homogenity rozptylu (Levene, 1960). Na určení normálního rozložení dat byl použit Shapiro - Wilkův test normality (Shapiro & Wilk, 1965). Pro mnohonásobné porovnání rozdílů středních hodnot byl použit multikomparativní Tukey HSD test (Meloun & Militký, 2006). Celkové zhodnocení složení společenstva AM hub bylo zpracováno pomocí mnohorozměrných analýz v programu Canoco 5 (Lepš & Šmilauer, 2003). Mnohorozměrná analýza byla provedena metodou detrendované korespondenční analýzy (DCA) a následně kanonickou korespondenční analýzou (CCA) s vyloučením OTU 14 z důvodu nízkého výskytu.

4. VÝSLEDKY

Diplomová práce byla svými tématy rozčleněna na dvě části, které si kladly odlišné otázky. Proto jsou i vyhodnocení nádobového experimentu a molekulární charakteristiky společenstev AM hub zpracována zvlášť na jednotlivé podkapitoly.

4.1. Vyhodnocení skleníkového nádobového experimentu

Ze skleníkového nádobového experimentu byla vyhodnocena kolonizace AM hub v kořenech, naměřená nadzemní a kořenová biomasa a koncentrace fosforu v biomase rostlin. Z růstových parametrů rostlin byly následně vypočítány mykorhizní odpovědi rostlin v těchto parametrech.

4.1.1. Kolonizace

Nejvyšší intenzita kolonizace AM hub v kořenech byla zjištěna u páru *A. amellus* a *I. salicina*, nejnižší u páru *B. media* a *B. pinnatum* (Tab. 14). Původ inokula statisticky významně ovlivnil kolonizaci kořenů u druhů *B. media* a *I. salicina*. U těchto druhů rostlin vedla inokulace společenstvem ze suchého trávníku k vyšší kolonizaci než inokulace společenstvem opuštěného pole. Původ půdy měl statisticky významný vliv na kolonizaci pouze u druhu *I. salicina*. Kolonizace byla vyšší v půdě z opuštěného pole než v půdě ze suchého trávníku, rozdíl se však neprojevil v mnohonásobných porovnáních (Tab. 14).

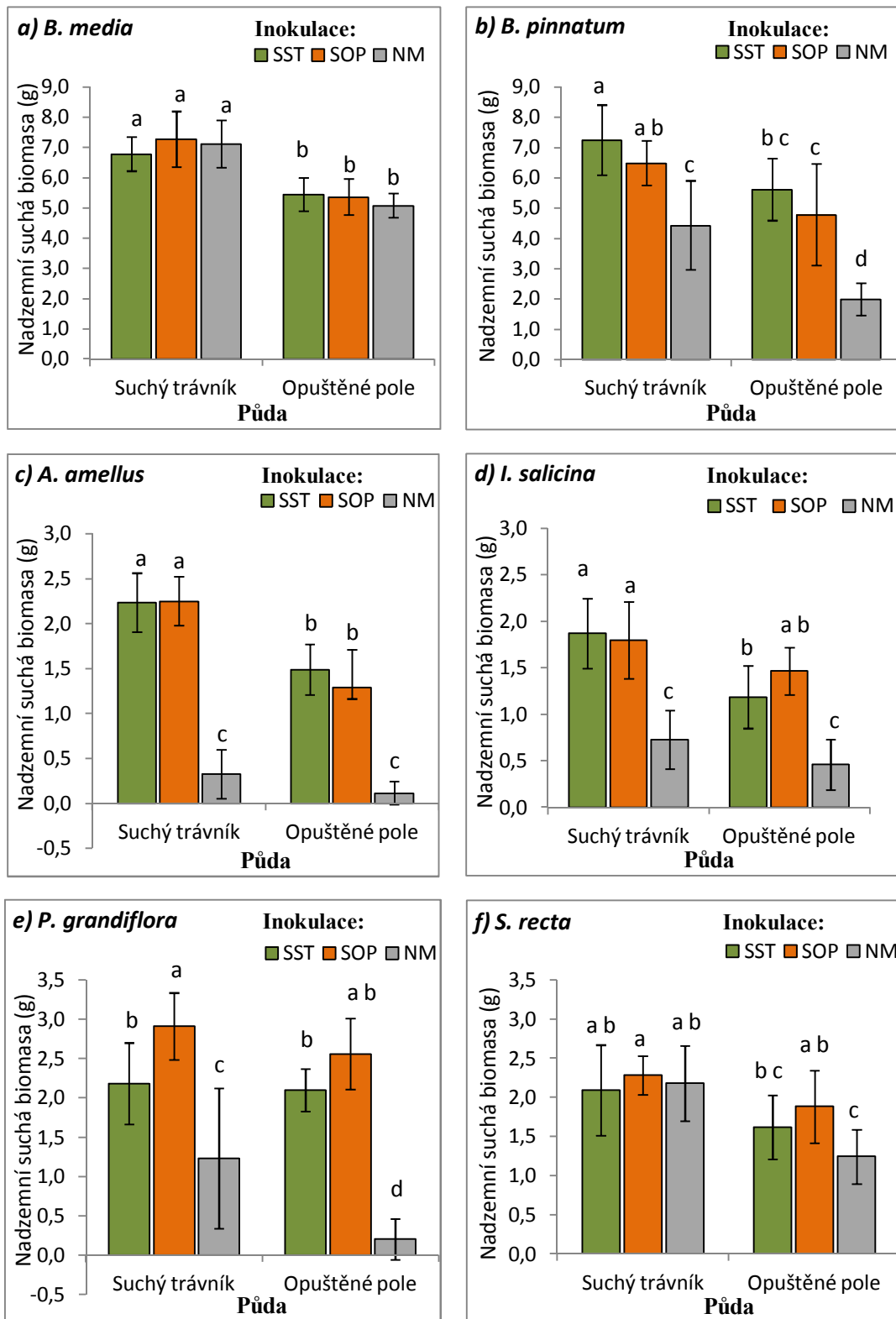
Kolonizace - M (%)							
Půda:	Inokulace:	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Suchý trávník	SST	37 a	31	86	82 ab	63	73
	SOP	29 b	25	88	76 b	65	65
Opuštěné pole	SST	37 a	29	87	87 a	71	80
	SOP	28 b	32	85	83 ab	66	69
Hladina signifikace (hodnota F)							
Faktory:		<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)		n.s. (0,040)	n.s. (0,538)	n.s. (0,292)	** (10,779)	n.s. (2,028)	n.s. (0,237)
Inokulace (B)		** (8,030)	n.s. (0,094)	n.s. (0,001)	** (8,829)	n.s. (0,162)	n.s. (0,091)
A x B		n.s. (0,018)	n.s. (1,640)	n.s. (0,958)	n.s. (0,245)	n.s. (0,2164)	n.s. (0,281)

Tab. 14: Vliv půdy a inokulace na kolonizaci kořenů AM houbami u jednotlivých druhů rostlin. Čísla jsou průměry z 9 - 10 opakování. Rozdílná písmena u variant označují odlišné varianty na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

SST - společenstvo suchého trávníku, SOP - společenstvo opuštěného pole, NM – nemykorhizní kontrola. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti podle dvoucestné analýzy variance: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n .s. není signifikantní ($p > 0,05$).

4.1.2. Nadzemní suchá biomasa

U všech zkoumaných rostlinných druhů byla nadzemní sušina statisticky významně ovlivněna faktorem půda (Tab. 15). Tento vliv spočíval v obecně vyšší nadzemní biomase rostlin rostoucí v půdě ze suchého trávníku než v půdě z opuštěného pole. Mnohonásobná porovnání prokázala signifikantní rozdíl mezi půdami buď ve všech inokulačních variantách (*B. media*, *B. pinnatum*), pouze v inokulovaných variantách (*A. amellus*, *I. salicina*) nebo pouze u neinokulovaných rostlin (*P. grandiflora*, *S. recta*) (Obr. 11). Vliv faktoru inokulace byl průkazný u všech rostlinných druhů kromě *B. media*. Spočíval ve vyšší nadzemní biomase inokulovaných rostlin ve srovnání s rostlinami neinokulovanými (nemykorhizními). Rozdíl mezi oběma inokuly (ze stráně a z opuštěného pole) byl zjištěn pouze u druhu *P. grandiflora*, kde rostliny v půdě ze suchého trávníku rostly lépe s inokulem z opuštěného pole než s inokulem ze suchého trávníku (Obr. 11; e). U druhu *S. recta* byl vliv inokulace, ač průkazný, velmi malý a v mnohonásobných porovnáních se téměř neprojevil (Obr. 11; f). Pouze u druhu *A. amellus* byla statisticky průkazná interakce obou faktorů (půdy a inokulace) (Tab. 15). Ta spočívala ve výrazně větším vlivu inokulace v půdě ze suchého trávníku než v půdě z opuštěného pole.



Obr. 11 (a, b, c, d, e, f): Vliv půdy a inokulace na hmotnost nadzemní suché biomasy u jednotlivých druhů rostlin. Sloupce znázorňují průměry z 9 - 10 opakování (u druhu *A. amellus* v nemykorhizních variantách pouze 4 opakování) a úsečky směrodatné odchylky. Rozdílná písmena u variant označují odlišné varianty na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

SST - společenstvo suchého trávníku, SOP - společenstvo opuštěného pole, NM – nemykorhizní kontrola

Hladina signifikace (hodnota F) - nadzemní suchá biomasa (g)						
Faktory:	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)	*** (110,324)	*** (34,110)	*** (38,695)	*** (24,936)	** (8,080)	*** (28,924)
Inokulace (B)	n.s. (0,571)	*** (31,476)	*** (37,005)	*** (59,427)	*** (56,813)	* (3,756)
A x B	n.s. (1,481)	n.s. (0,177)	** (6,715)	n.s. (2,269)	n.s. (0,811)	n.s. (2,298)

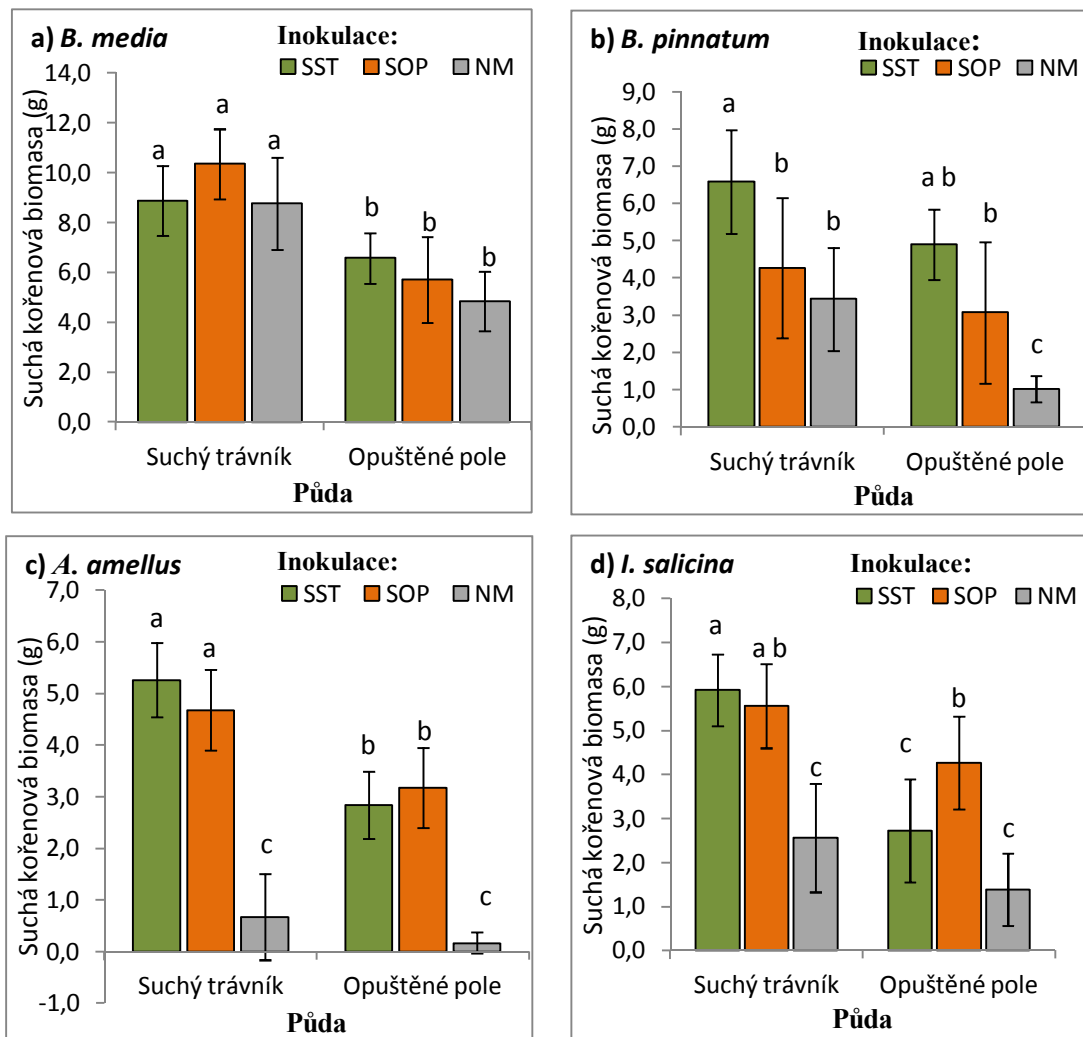
Tab. 15: Vliv jednotlivých faktorů a jejich interakce na hmotnost nadzemní suché biomasy rostlin. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a dosažené hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. není signifikantní ($p > 0,05$).

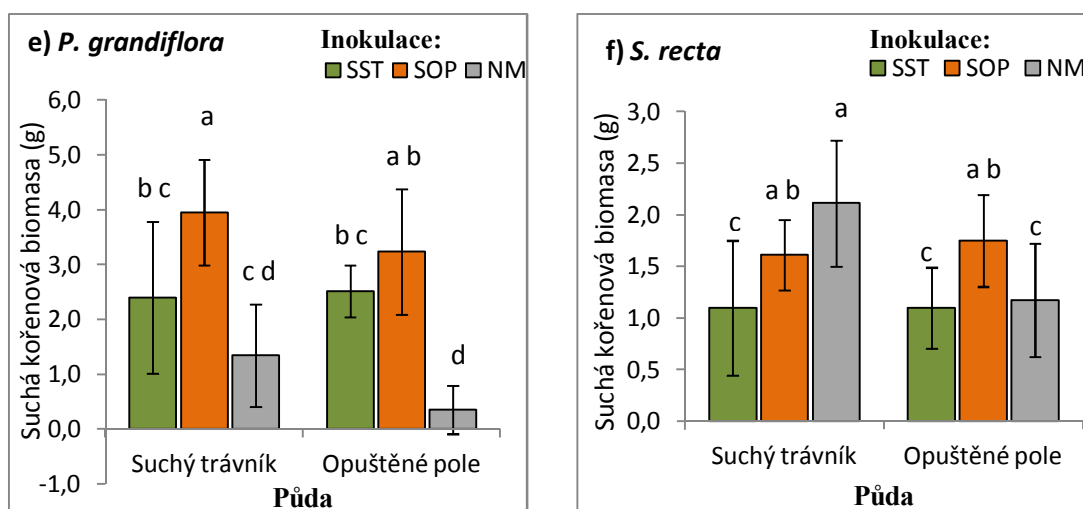
4.1.3. Kořenová suchá biomasa

Faktor půda měl statisticky významný vliv u všech druhů zkoumaných rostlin (Tab. 16), který spočíval v obecně vyšší kořenové biomase rostlin rostoucí v půdě ze suchého trávníku. Mnohonásobná porovnání ukázala rozdíl v kořenové biomase u všech inokulačních variant (*B. media*), v obou variantách s přidavkem inokula (*A. amellus*), v jedné z variant s přidavkem inokula (*I. salicina*), pouze u nemykorhizních kontrol (*B. pinnatum*, *S. recta*) nebo vůbec (*P. grandiflora*) (Obr. 12).

Faktor inokulace měl rovněž statisticky významný vliv u všech zkoumaných rostlinných druhů. Ne všechny inokulované varianty však měly vyšší kořenovou sušinu než neinokulované kontroly dle mnohonásobných porovnání (například *B. media* a *S. recta*) (Obr. 12; a, f). U páru *P. grandiflora* a *S. recta* byla kořenová biomasa vyšší při inokulaci společenstvem z opuštěného pole než společenstvem suchého trávníku nezávisle na půdě, v které byly rostliny pěstovány, u druhu *B. pinnatum* byla situace opačná (Obr. 12; b, e, f). Mnohonásobná porovnání u druhu *B. media* nezjistila žádný prokazatelný rozdíl v kořenové biomase, přestože byl prokázán statisticky významný vliv inokulace, *A. amellus* měla prokazatelný rozdíl v biomase pouze u nemykorhizních variant. Mnohonásobná porovnání inokulačních variant ukázala rozdíl v kořenové biomase při růstu na obou půdách (*S. recta*), pouze v půdě ze suchého trávníku (*B. pinnatum*, *P. grandiflora*) nebo pouze v půdě z opuštěného pole (*I. salicina*) (Obr. 12).

Statisticky významná interakce obou faktorů byla zjištěna u druhů *B. media*, *A. amellus*, *I. salicina* a *S. recta* (Tab. 16). U *B. media* tato interakce spočívala v odlišných trendech vlivu inokulace v obou půdách, které však nebyly průkazné mnohonásobných porovnáních. U *A. amellus*, shodně s její nadzemní biomasou, stejně jako u druhu *I. salicina* spočívala ve výrazně větším vlivu inokulace v půdě ze suchého trávníku než v půdě z opuštěného pole.





Obr. 12 (a, b, c, d, e, f): Vliv půdy a inokulace na hmotnost suché kořenové biomasy u jednotlivých druhů rostlin. Sloupce znázorňují průměry z 9 - 10 opakování (u druhů *A. amellus* a *P. grandiflora* v nemykorhizních variantách pouze 4 - 7 opakování) a úsečky směrodatné odchylky. Rozdílná písmena u variant označují odlišné varianty na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

SST - společenstvo suchého trávníku, SOP - společenstvo opuštěného pole, NM – nemykorhizní kontrola

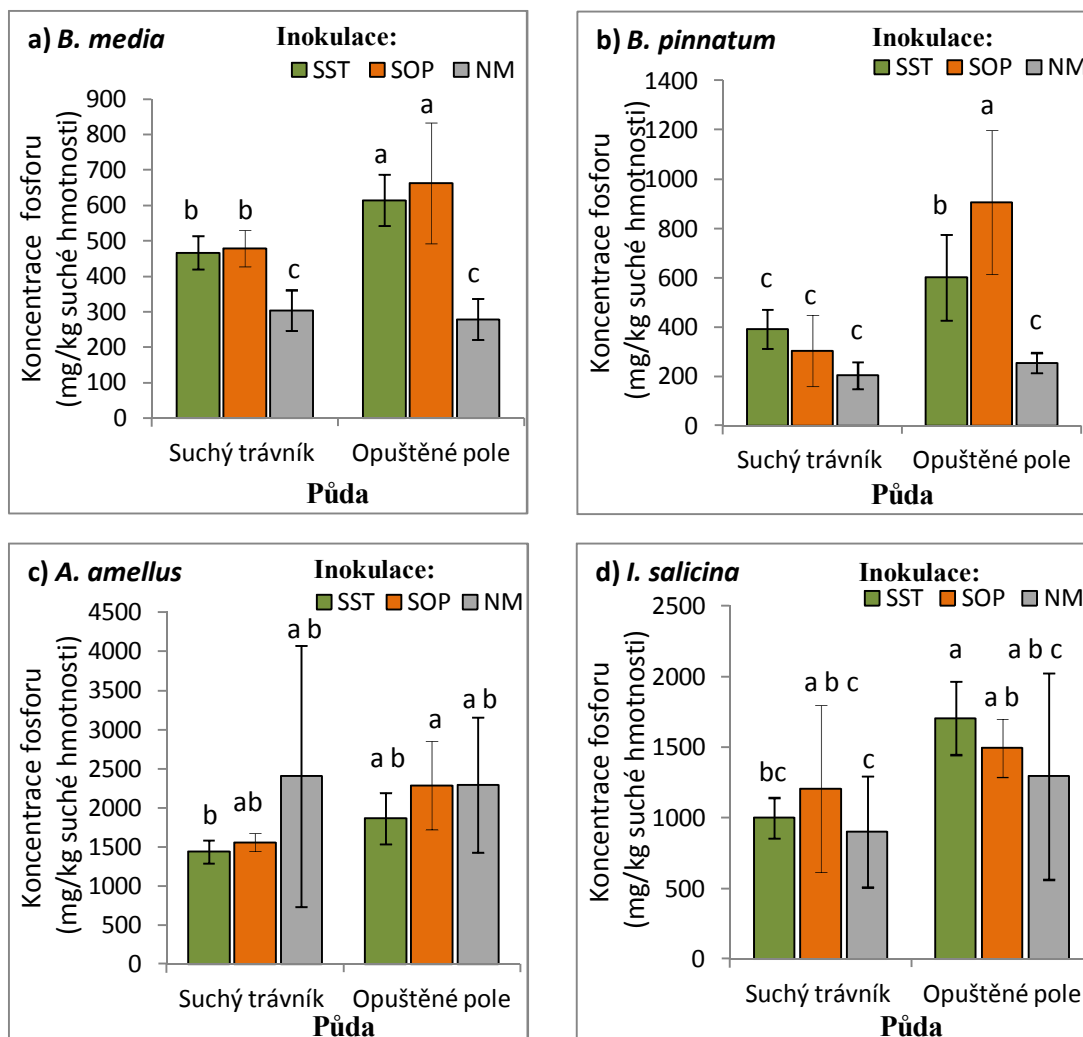
Hladina signifikace (hodnota F) – suchá kořenová biomasa (g)						
Faktory:	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)	*** (92,318)	*** (23,368)	*** (41,386)	*** (51,125)	* (4,095)	* (4,037)
Inokulace (B)	* (3,824)	*** (31,256)	*** (81,574)	*** (46,418)	*** (34,887)	*** (7,951)
A x B	* (3,371)	n.s. (0,934)	** (5,363)	** (6,204)	n.s. (1,635)	* (6,596)

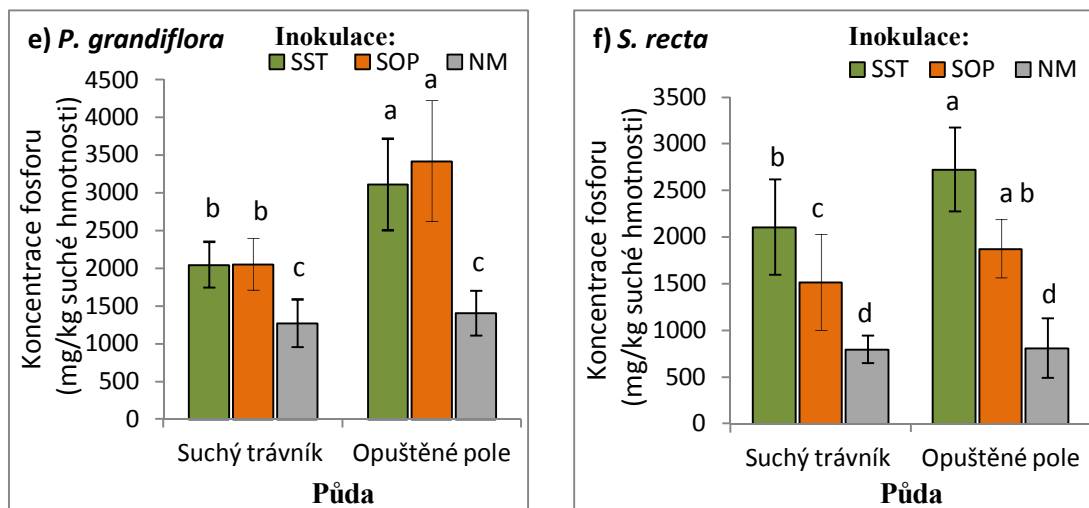
Tab. 16: Vliv jednotlivých faktorů a jejich interakce na hmotnost suché kořenové biomasy rostlin. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. není statisticky významně odlišný ($p > 0,05$).

4.1.4. Koncentrace fosforu v nadzemní biomase rostlin

Faktor půda měl na koncentraci fosforu v nadzemní biomase statisticky významný vliv u všech druhů rostlin (Tab. 17). Obecně byla koncentrace fosforu vyšší u rostlin pěstovaných v půdě z opuštěného pole než u rostlin v půdě ze suchého trávníku. Mnohonásobná porovnání prokázala statisticky významný rozdíl mezi půdami pouze v inokulovaných variantách (Obr. 13). Vliv faktoru inokulace byl průkazný u dvou

rostlinných párů (*B. media*, *B. pinnatum* a *P. grandiflora*, *S. recta*) (Tab. 17) a spočíval ve vyšší koncentraci fosforu v nadzemní biomase u rostlin inokulovaných než u rostlin kontrolních. Rozdíl mezi inokuly se projevil pouze u *B. pinnatum* a *S. recta* (Obr. 13; b, f). Druh *B. pinnatum* pěstovaný v půdě z opuštěného pole měl s inokulem z opuštěného pole vyšší koncentraci fosforu než s inokulem ze suchého trávníku. Naopak druh *S. recta* měl v půdě ze suchého trávníku vyšší koncentraci fosforu při inokulaci společenstvem ze suchého trávníku než společenstvem z opuštěného pole. Interakce mezi oběma faktory byla statisticky významná u druhů *B. media*, *B. pinnatum* a *P. grandiflora* (Tab. 17; a, b, e). Interakce vždy spočívala ve větším vlivu inokulace v půdě z opuštěného pole než v půdě ze suchého trávníku.





Obr. 13 (a, b, c, d, e, f): Vliv půdy a inokulace na koncentraci fosforu v nadzemní biomase jednotlivých druhů rostlin. Sloupce znázorňují průměry z 9 - 10 opakování (u druhu *A. amellus* pouze 2 - 4 opakování a u *P. grandiflora* 6 - 9 opakování v nemykorhizních variantách) a úsečky směrodatné odchylky. Rozdílná písmena u variant označují odlišné varianty na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

SST - společenstvo suchého trávníku, SOP - společenstvo opuštěného pole, NM – nemykorhizní kontrola

Hladina signifikace (hodnota F) - obsah fosforu v suché nadzemní biomase (mg/kg)						
Faktory:	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)	*** (20,738)	*** (48,224)	* (6,510)	** (16,460)	*** (40,908)	** (8,467)
Inokulace (B)	*** (61,693)	*** (33,444)	n.s. (2,324)	n.s. (2,203)	*** (63,708)	*** (92,213)
A x B	*** (8,210)	*** (10,657)	n.s. (0,493)	n.s. (1,216)	* (4,626)	n.s. (2,483)

Tab. 17: Vliv jednotlivých faktorů a jejich interakce na obsah fosforu v nadzemní biomase rostlin (mg/kg). V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. není statisticky významně odlišný ($p > 0,05$).

4.1.5. Mykorhizní odpověď

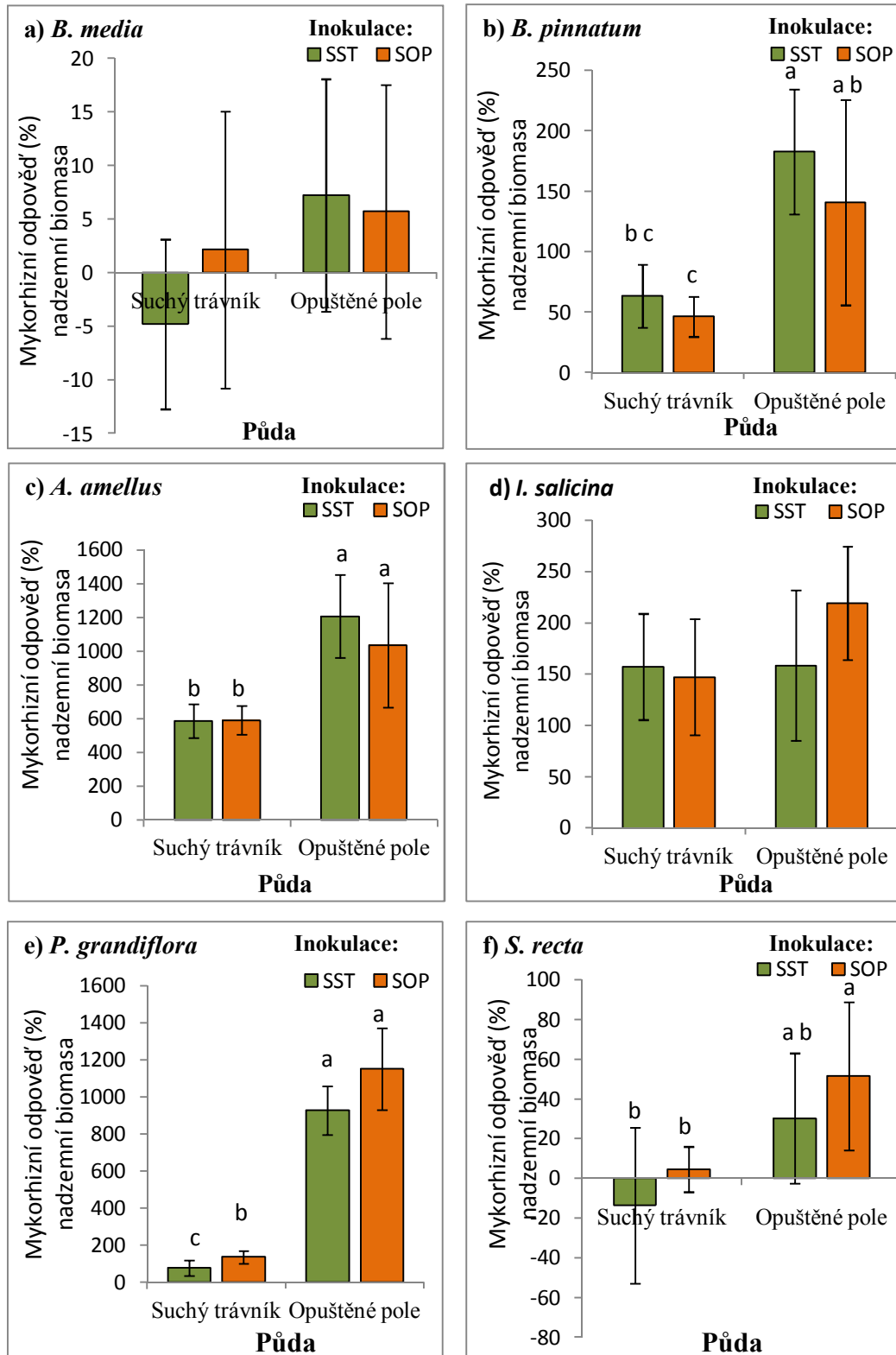
Mykorhizní odpověď je parametrem, který nám umožňuje porovnat jednotlivé druhy rostlin mezi sebou v měřených parametrech, které jsou mezi druhy rostlin odlišné (jako jsou například hmotnost nadzemní suché biomasy, hmotnost kořenové suché biomasy, příjem fosforu). Z mykorhizní odpovědi lze odvodit, kolikrát byla mykorhizní rostlina v měřeném parametru menší / větší než rostlina kontrolní nemykorhizní.

Faktor půda statisticky prokazatelně ovlivnil mykorhizní odpověď nadzemní biomasy a mykorhizní odpověď příjmu fosforu u všech rostlin zahrnutých do experimentu kromě druhu *I. salicina*, jehož mykorhizní odpověď nebyla ovlivněna ani jedním z experimentálních faktorů nebo interakcí mezi nimi (Tab. 18). Mykorhizní odpověď byla obecně větší u rostlin rostoucí v půdě z opuštěného pole než v půdě ze suchého trávníku a to u obou typů odpovědi (Obr. 14, Obr. 15).

Faktor inokulace, který zde, na rozdíl od předchozích analýz, zahrnuje pouze rozdíly mezi oběma typy inokul, ne však rozdíly mezi inokulovanými a neinokulovanou variantou, statisticky významně ovlivnil mykorhizní odpověď nadzemní biomasy u druhů *B. pinnatum* a *P. grandiflora* a mykorhizní odpověď příjmu fosforu u druhu *S. recta* (Tab. 18). U druhů *S. recta* a *B. pinnatum* byla mykorhizní odpověď obecně větší v případě inokulace společenstvem ze suchého trávníku než při inokulaci společenstvem z opuštěného pole. U druhu *P. grandiflora* byla zaznamenána větší mykorhizní odpověď nadzemní biomasy na inokulum z opuštěného pole (Obr. 14; e). Interakce mezi faktory půda a inokulace byla statisticky průkazná u mykorhizní odpovědi příjmu fosforu u druhu *B. pinnatum* (Tab. 18; b) - spočívala ve větší mykorhizní odpovědi při inokulaci společenstvem opuštěného pole než společenstvem ze suchého trávníku při kultivaci rostlin v půdě z opuštěného pole, ne však v půdě ze suchého trávníku.

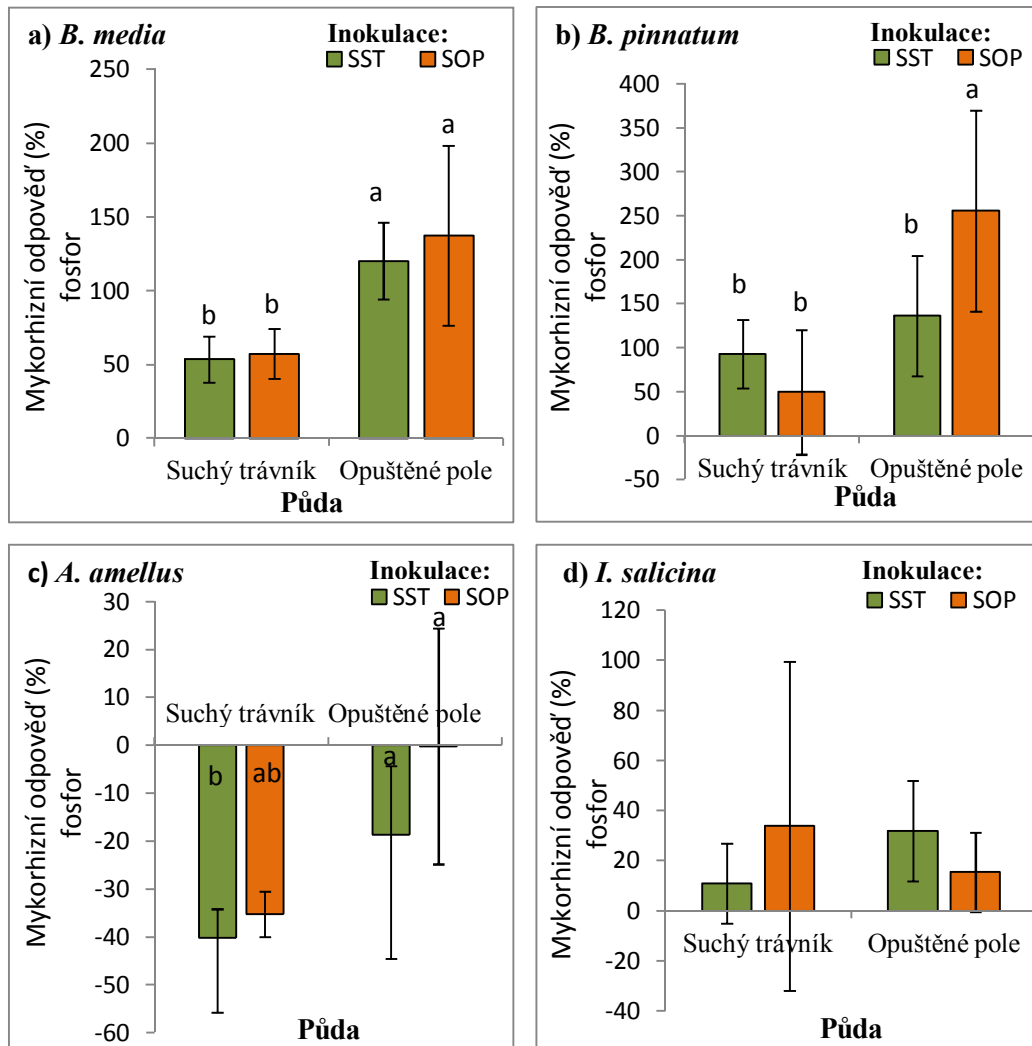
Porovnání mykorhizních odpovědí nadzemní biomasy a příjmu fosforu na jednotku biomasy ukázalo u páru *B. media* a *B. pinnatum* vyšší mykorhizní odpověď příjmu fosforu než růstu (Obr. 14, Obr. 15). Například u rostliny *B. media* byla mykorhizní odpověď příjmu fosforu přibližně 130 % v půdě z opuštěného pole (což odpovídá tomu, že inokulované rostliny měly až 2,3krát vyšší příjem fosforu na jednotku nadzemní biomasy než nemykorhizní kontroly) a přibližně 55 % v půdě ze suchého trávníku, ale mykorhizní odpověď nadzemní biomasy byla v půdě z opuštěného pole pouze kolem 6 % a v půdě ze suchého trávníku dokonce záporná (což odpovídá tomu, že inokulované rostliny pěstované v půdě ze suchého trávníku byly menší než rostliny neinokulované). Naopak pár *A. amellus* a *I. salicina* měl mnohonásobně vyšší mykorhizní odpověď nadzemní biomasy než odpověď příjmu fosforu, která byla u *A. amellus* dokonce záporná (v případě pěstování rostlin v půdě ze suchého trávníku až -40 %). Mykorhizní odpověď nadzemní biomasy dosahovala v případě růstu rostlin na opuštěném poli až přibližně 1100 %, což odpovídá tomu, že inokulované rostliny měly až 12 krát větší nadzemní sušinu než rostliny neinokulované.

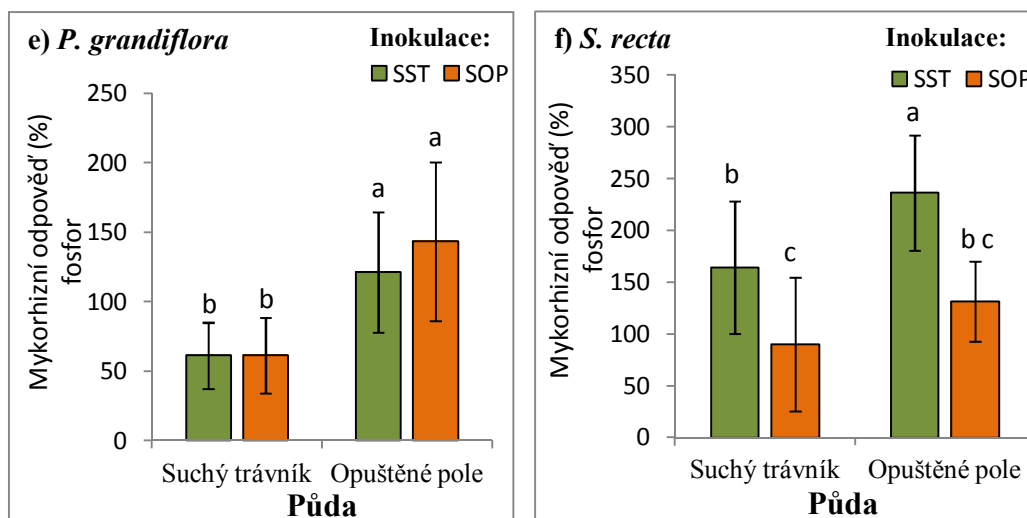
Také druh *P. grandiflora* měl větší mykorhizní odpověď nadzemní biomasy (v půdě z opuštěného pole dosahovala hodnot kolem 1000 %, na suchém trávníku pouze kolem 100 %) a menší mykorhizní odpověď v příjmu fosforu. Naopak tomu bylo u druhu *S. recta*, kde mykorhizní odpověď příjmu fosforu převyšovala mykorhizní růstovou odpověď.



Obr. 14 (a, b, c, d, e, f): Vliv půdy a inokulace na mykorhizní odpověď nadzemní suché biomasy u jednotlivých druhů rostlin. Sloupce značí průměr z 10 opakování a úsečky směrodatné odchylky. Rozdílná písmena u variant označují odlišné varianty na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

SST-společenstvo suchého trávníku, SOP- společenstvo opuštěného pole





Obr. 15 (a, b, c, d, e, f): Vliv půdy a inokulace na mykorhizní odpověď příjmu fosforu na jednotku nadzemní suché biomasy u jednotlivých druhů rostlin. Sloupce znázorňují průměr z 9 - 10 opakování a úsečky směrodatné odchylky. Rozdílná písmena u variant označují odlišné varianty na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

SST-společenstvo suchého trávníku, SOP- společenstvo opuštěného pole

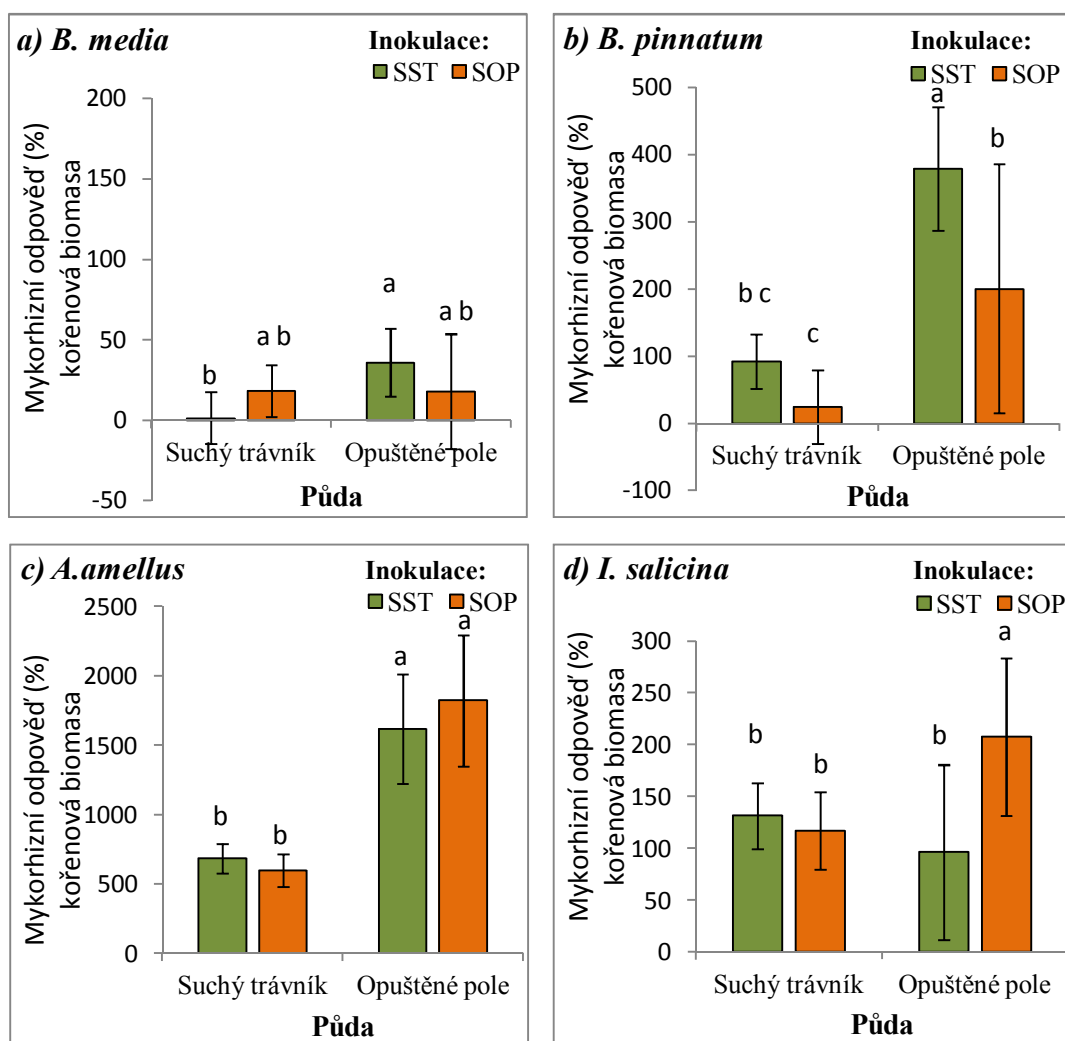
a) Hladina signifikace (hodnota F) - mykorhizní odpověď (nadzemní suchá biomasa)						
faktory:	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)	* (4,981)	*** (33,479)	*** (40,903)	n.s. (3,748)	*** (218,385)	** (12,055)
Inokulace (B)	n.s. (0,598)	* (4,404)	n.s. (1,189)	n.s. (1,806)	** (9,748)	n.s. (2,374)
A x B	n.s. (1,474)	n.s. (0,225)	n.s. (1,512)	n.s. (3,486)	n.s. (3,475)	n.s. (0,986)

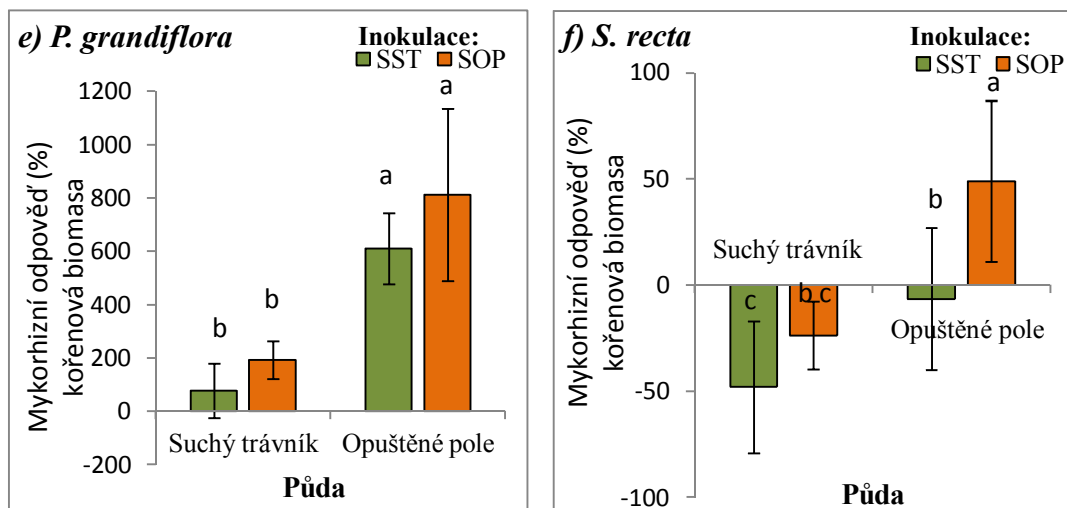
b) Hladina signifikace (hodnota F) - mykorhizní odpověď (příjem fosforu)						
faktory:	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)	*** (66,562)	*** (25,649)	*** (22,514)	n.s. (0,030)	*** (44,307)	** (9,847)
Inokulace (B)	n.s. (0,422)	n.s. (2,389)	n.s. (0,960)	n.s. (2,165)	n.s. (0,281)	*** (24,518)
A x B	n.s. (0,000)	** (10,891)	n.s. (1,030)	n.s. (3,532)	n.s. (0,521)	n.s. (0,724)

Tab. 18 (a, b): Vliv jednotlivých faktorů a jejich interakce na mykorhizní odpověď rostlin. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. není statisticky významně odlišný ($p > 0,05$).

V mykorhizní odpovědi kořenové biomasy se u všech experimentálních rostlin kromě *I. salicina* projevil statisticky významný vliv faktoru půda (Tab. 19). Obecný

trend ukazuje, stejně jako u nadzemní biomasy, vyšší mykorhizní odpověď kořenové biomasy u rostlin pěstovaných v půdě z opuštěného pole (Obr. 16). Na rozdíl od nadzemní biomasy byl však růst kořenů u většiny rostlin prokazatelně ovlivněn i faktorem inokulace, který nebyl průkazný pouze u *B. media* a *A. amellus*. U druhů *P. grandiflora* a *S. recta* spočíval v trendu k vyšší mykorhizní odpovědi na inokulaci společenstvem opuštěného pole ve srovnání se společenstvem suchého trávníku (Obr. 16; e, f). U druhu *I. salicina* byl tento rozdíl patrný pouze v půdě z opuštěného pole a byla zde statisticky významná i interakce obou faktorů (Obr. 16; d). Druh *B. pinnatum* naopak vykazoval vyšší mykorhizní odpověď při inokulaci společenstvem ze suchého trávníku (Obr. 16; b). Interakce mezi faktory byla signifikantní také u druhu *B. media*, kde byla mykorhizní odpověď kořenové biomasy sice malá, ale s tendencí k opačným rozdílům mezi inokuly v závislosti na půdě (Obr. 16; a). Mykorhizní odpověď kořenové biomasy a mykorhizní odpověď nadzemní biomasy vykazovaly u všech druhů rostlin podobný trend (Obr. 14, Obr. 16).





Obr. 16 (a, b, c, d, e, f): Vliv půdy a inokulace na mykorhizní odpověď kořenové biomasy u jednotlivých druhů rostlin. Sloupce znázorňují průměr z 9 - 10 opakování a úsečky směrodatné odchylky. Rozdílná písmena označují varianty odlišné na hladině významnosti $p \leq 0,05$.

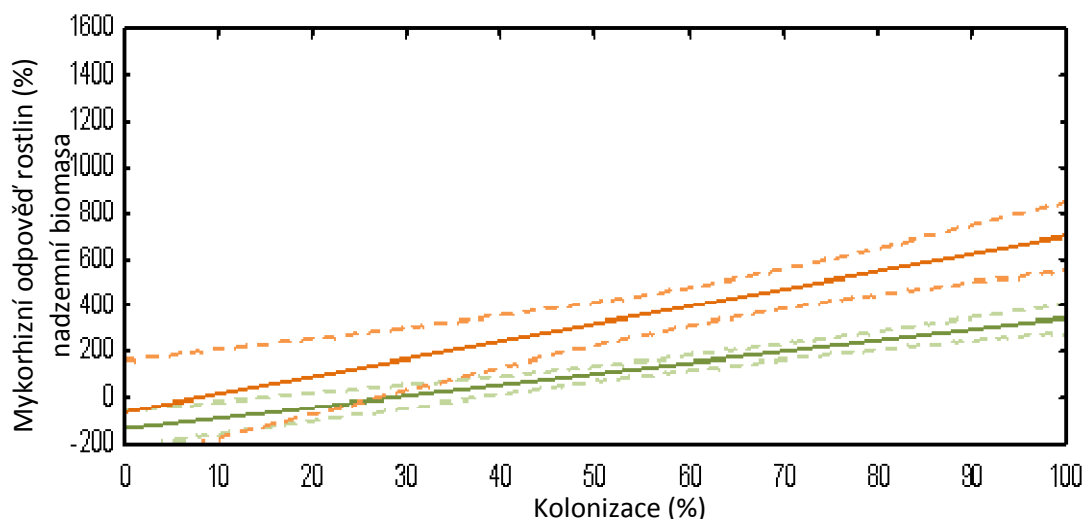
SST-společenstvo suchého trávníku, SOP- společenstvo opuštěného pole

Hladina signifikace (hodnota F) - mykorhizní odpověď (kořenová suchá biomasa)						
	<i>B. media</i>	<i>B. pinnatum</i>	<i>A. amellus</i>	<i>I. salicina</i>	<i>P. grandiflora</i>	<i>S. recta</i>
Půda (A)	* (5,237)	*** (47,714)	*** (122,429)	n.s. (2,010)	*** (141,198)	*** (33,745)
Inokulace (B)	n.s. (0,005)	*** (13,838)	n.s. (1,178)	* (6,114)	** (8,933)	*** (16,489)
A x B	* (5,419)	n.s. (1,600)	n.s. (3,003)	** (10,276)	n.s. (0,050)	n.s. (2,501)

Tab. 19: Vliv jednotlivých faktorů a jejich interakce na mykorhizní odpověď rostlin kořenové biomasy. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n. s. není statisticky významně odlišný ($p > 0,05$).

4.1.6. Korelace mezi kolonizací kořenů a mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin

Intenzita kolonizace kořenů a mykorhizní odpověď nadzemní biomasy spolu pozitivně korelovaly ve všech variantách původu půdy a inokula napříč všemi druhy rostlin (Tab. 20). Korelační koeficient byl vyšší u rostlin rostoucí v půdě ze suchého trávníku (korelační koeficient 0,566) než u rostlin rostoucích v půdě z opuštěného pole (korelační koeficient 0,388). Korelace je zobrazena na Obr. 17.



Ob. 17: Korelace mezi intenzitou kolonizací kořenů rostlin AM houbami a jejich mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy. Korelace, vytvořené zvláště pro rostliny pěstované v půdě ze suchého trávníku (zeleně - korelační koeficient 0,566) a rostliny pěstované v půdě z opuštěného pole (hnědě - korelační koeficient 0,388), zahrnují všechny druhy rostlin a inokulační varianty. Přerušované čáry vyznačují konfidenční intervaly s pravděpodobností 95 %.

Korelace mezi kolonizací a mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin		
Půda:	Inokulace:	Korelační koeficient
Suchý trávník	SST	0,516
	SOP	0,619
Opuštěné pole	SST	0,377
	SOP	0,405
Suchý trávník	SST + SOP	0,566
Opuštěné pole	SST + SOP	0,388

Tab. 20: Tabulka zobrazuje korelační koeficienty mezi mykorhizní kolonizací kořenů a mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin u jednotlivých variant půdy a inokula napříč všemi druhy rostlin. Korelace jsou statisticky významné na hladině významnosti $p < 0,05$.

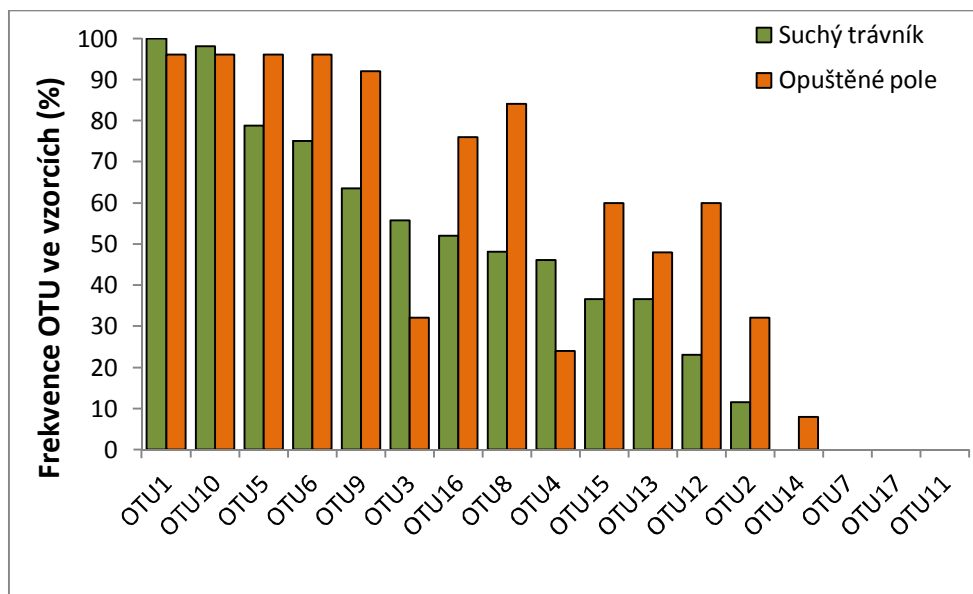
SST - společenstvo suchého trávníku, SOP - společenstvo opuštěného pole

4.2. Vyhodnocení společenstva AM hub v kořenech rostlin z lokality

Pomocí T-RFLP a programu TRAMPR byl zjištěn výskyt taxonů AM hub, které byly vymezeny na základě fylogenetické analýzy databáze sekvencí v jednotlivých kořenových systémech. V 77 analyzovaných vzorcích bylo nalezeno 14 ze 17 OTU z databáze sekvencí. Nebyly nalezeny OTU 6 (*Funneliformis mosseae*), OTU 11 (*Scutellospora* sp.) a OTU 17 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Paraglomeraceae) (viz Kapitola 3. Metodika, Obr. 6).

4.2.1. Frekvence OTU ve vzorcích

Biotopy suchý trávník a opuštěné pole se lišily v četnosti výskytu jednotlivých OTU v kořenových systémech. Opuštěné pole mělo obecně výrazně vyšší četnost jednotlivých OTU s výjimkou OTU 3 (*Rhizophagus* sp.) a OTU 4 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Glomeraceae), které byly nalezeny ve vyšší četnosti na biotopu suchý trávník (Obr. 18). OTU 1 (*Rhizophagus irregularis*) a OTU 10 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Glomeraceae) byly nejčastěji zastoupené - vyskytovaly se v téměř 100 % analyzovaných vzorků. Vysokou četnost výskytu měly i OTU 5 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Glomeraceae), OTU 6 (*Septoglomus* sp.) a OTU 9 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Glomeraceae). Ve vzorcích z opuštěného pole byla četnost těchto OTU okolo 95 %, ve vzorcích ze suchého trávníku to bylo méně, přibližně 70 %. Také OTU 16 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Diversisporaceae) a OTU 8 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Glomeraceae) měly na opuštěném poli vysokou četnost zastoupení, ale u vzorků ze suchého trávníku byla četnost těchto OTU výrazně nižší. OTU 2 (*Rhizophagus* sp.) měl velice nízkou četnost na suchém trávníku (12 %). OTU 14 (*Archaeospora* sp.) byl nalezen pouze ve vzorcích na opuštěném poli a to ve velmi nízké četnosti (8 %).

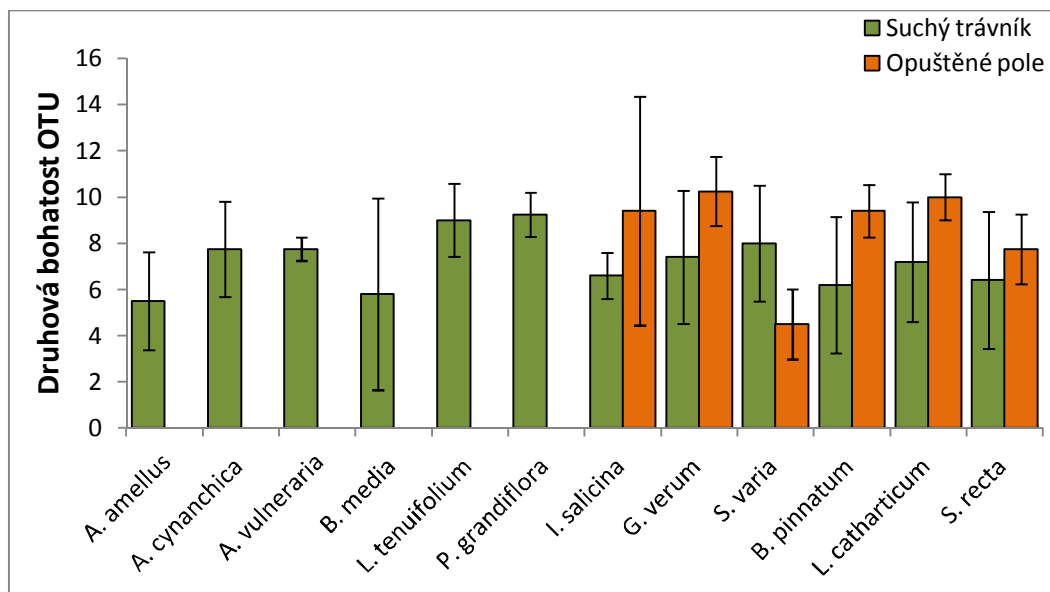


Obr. 18: Graf zobrazuje frekvenci jednotlivých OTU ve vzorcích z biotopu suchý trávník (zeleně) a z biotopu opuštěné pole (oranžově).

4.2.2. Druhová bohatost AM hub v rostlinných druzích na lokalitě

Průměrný počet OTU zjištěný v kořenovém systému jednoho rostlinného druhu se pohyboval od 5 do 9 OTU na biotopu suchý trávník a od 4 do 10 OTU na biotopu opuštěné pole.

Druhová bohatost společenstva AM hub rostlinných druhů rostoucích na obou biotopech byla signifikantně vyšší na biotopu opuštěné pole než na biotopu suchého trávníku (Obr. 19, Tab. 21). Vliv biotopu se však neprojevil v mnohanásobném porovnání. Rostlinný druh ani interakce mezi faktory neměla na druhovou bohatost AM hub statisticky významný vliv (Tab. 21). Druhová bohatost AM hub v kořenech rostlin ze suchého trávníku (včetně druhů které se vyskytovaly pouze tam) se mezi rostlinnými druhy nelišila (Tab. 21).



Obr. 19: Druhová bohatost AM hub v jednotlivých rostlinných druzích z biotopů suchý trávník (zeleně) a opuštěné pole (oranžově). Sloupce značí průměrný počet OTU na kořenový systém a úsečky směrodatné odchylky.

Druhy rostlin rostoucí na obou biotopech		Druhy rostoucí na suchém trávníku	
faktory:	hladina significance (F-hodnota)	faktor:	hladina significance (F-hodnota)
rostlinný druh (A)	n.s. (1,222)	rostlinný druh	n.s. (1,657)
biotop (B)	* (5,906)		
A x B	n.s. (1,750)		

Tab. 21: Vliv jednotlivých faktorů na druhovou bohatost AM hub v kořenech jednotlivých druhů rostlin. Dvoucestná ANOVA byla použita na vyhodnocení vlivu faktorů rostlinný druh (A), biotop (B) a jejich interakci (A x B) na druhovou bohatost AM hub v kořenech rostlin rostoucí na obou biotopech. Jednocestná ANOVA byla použita na vyhodnocení vlivu faktoru rostlinný druh na druhovou bohatost AM hub v kořenech rostlin rostoucí pouze na suchém trávníku. V tabulce jsou uvedeny hodnoty F (v závorkách) a hladiny významnosti: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n.s. není statisticky významně odlišný ($p > 0,05$).

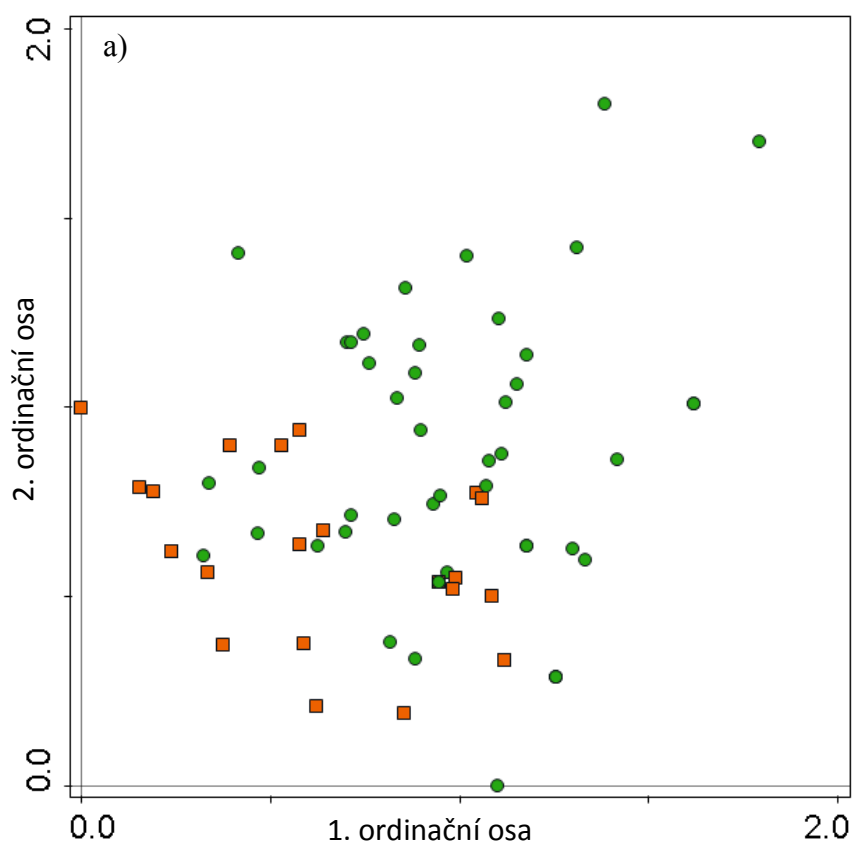
4.2.3. Mnohorozměrné analýzy společenstev AM hub na lokalitě

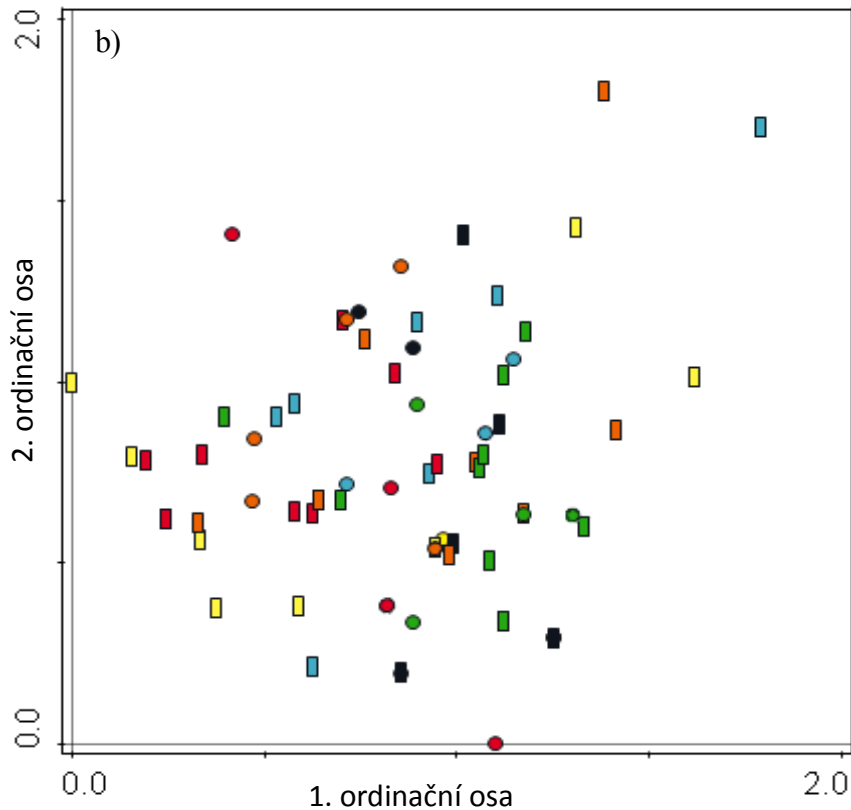
Pro celkové zhodnocení složení společenstva AM hub na lokalitě byly použity mnohorozměrné analýzy. Nejprve byla použita detrendovaná korespondenční analýza (DCA) pro zjištění hlavního směru variability v datech a pak kanonická korespondenční

analýza (CCA) pro zhodnocení vlivu biotopu a rostlinných druhů na složení společenstva AM hub.

4.2.3.1. Zachycení hlavního směru variability v datech - nepřímá DCA

Pro zachycení hlavního trendu ve složení AM hub na lokalitě byla použita nepřímá DCA analýza. 1. ordinační osou se vysvětlilo 20,9 % a 2. ordinační osou 13,8 % celkové variability. Rozložení vzorků podél 1. a 2. ordinační osy naznačuje rozdělení vzorků podle biotopu (Obr. 20; a) a naopak nenaznačuje rozdělení podle rostlinného druhu (Obr. 20; b).



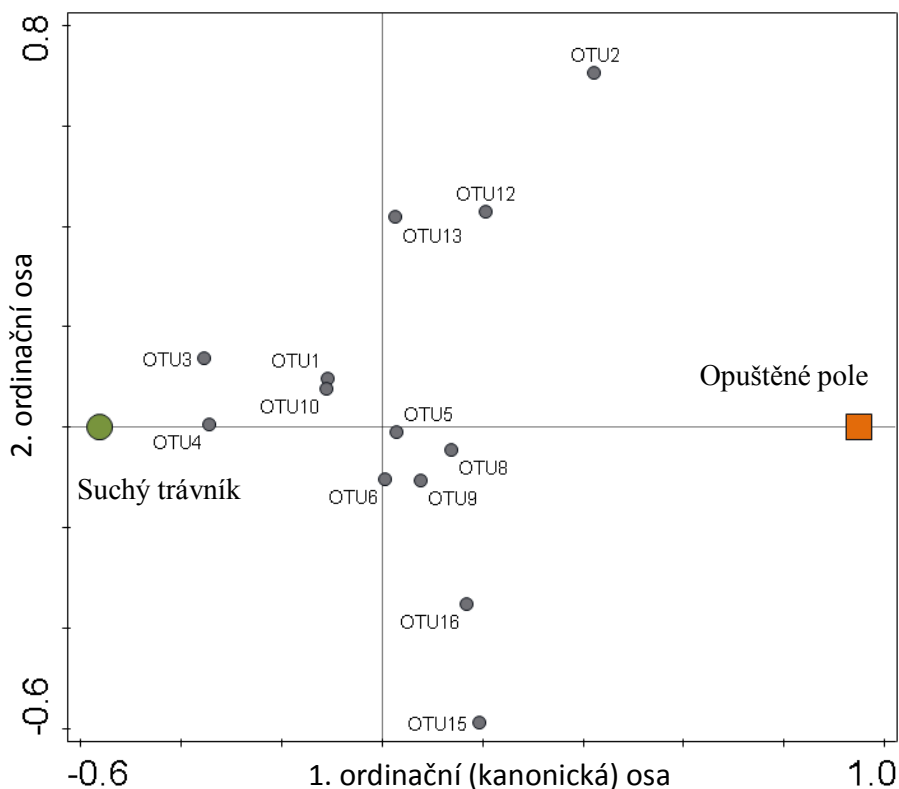


Obr. 20 (a, b): Ordinační diagram DCA s vizualizovanou klasifikací všech vzorků podél 1. a 2. ordinační osy. (a) označení vzorků podle biotopu: -suchý trávník (zelené kolečko), -opuštěné pole (oranžový čtverec); (b) označení vzorků podle rostlinného druhu: rostliny rostoucí pouze na suchém trávníku – kolečko, rostoucí na suchém trávníku i na opuštěném poli – obdélník, taxonomicky příbuzné rostliny jsou označeny stejnou barvou (*A. amellus*, *I. salicina* – černá; *A. cynanchica*, *G. verum* – červená; *A. vulneraria*, *S. varia* – žlutá; *B. media*, *B. pinnatum* – modrá; *L. tenuifolium*, *L. catharticum* - oranžová; *P. grandiflora*, *S. recta* - zelená). 1. ordinační osa vysvětluje 20,9 % a 2. ordinační osa vysvětluje 13,8 % variability.

4.2.3.2. Vliv biotopu na výskyt AM hub - přímá CCA analýza

Vliv biotopu na výskyt jednotlivých AM hub je patrný z diagramu parciální CCA analýzy s vysvětující proměnou "biotop" a proměnou "rostlinný druh" jako kovariátou, kde 1. ordinační osa (kanonická) vysvětluje 8,1 % (6,6 % při ošetření na počet stupňů volnosti; $F = 5,606$; $p = 0,002$) a 2. ordinační osa (nekanonická) 17,4 % variability (Obr. 21). OTU 3 a OTU 4 se vyskytovaly více na biotopu suchý trávník, OTU 2 byl

častější v biotopu opuštěné pole. OTU 5, OTU 6 a OTU 13 byly zcela rovnoměrně distribuované mezi oběma biotopy.



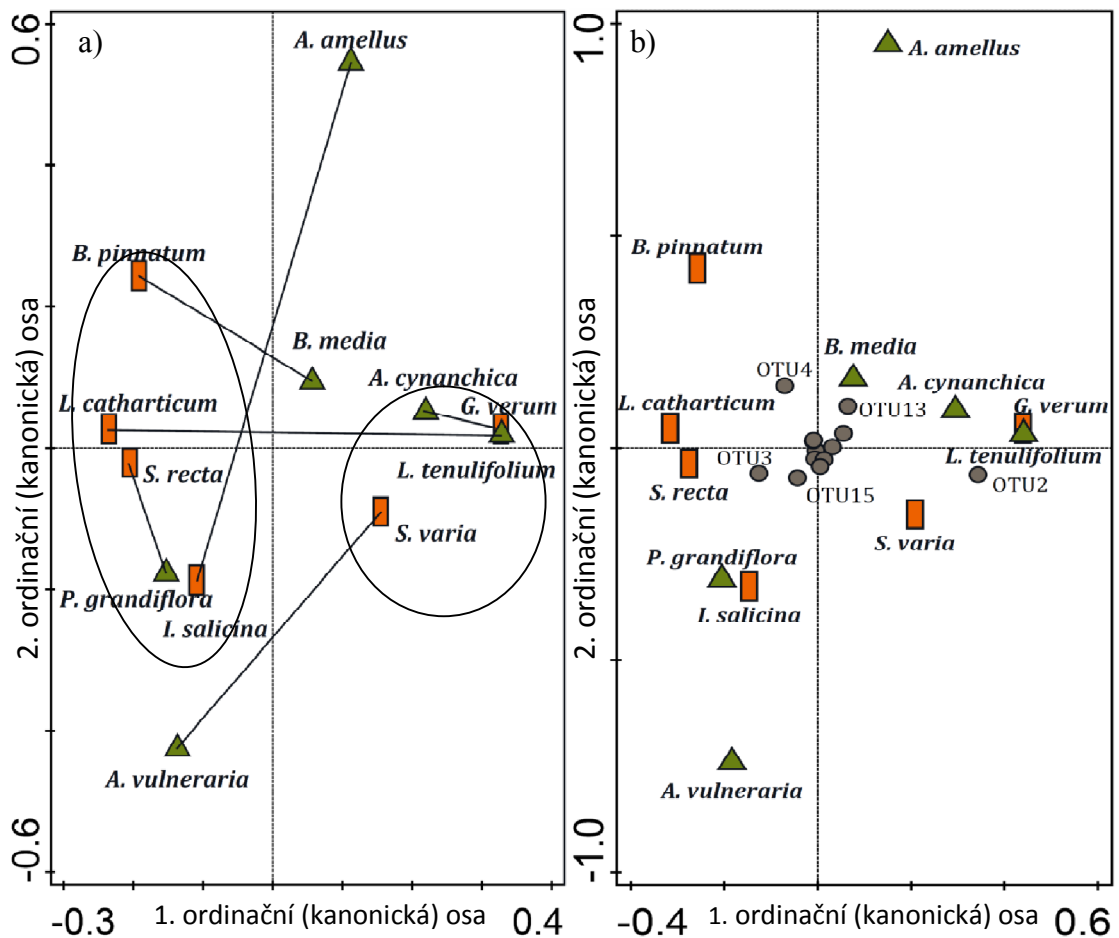
Obr. 21: Ordinační diagram parciální CCA analýzy znázorňující rozložení OTU podél 1. kanonické osy jako reakci proměnnou „biotop“ s kovariátou „rostlinný druh“ ($F = 5,606$, $p = 0,002$). 1. ordinační osa (kanonická) vysvětluje 8,1 % variability (6,6 % při ošetření na počet stupňů volnosti) a 2. ordinační osa (nekanonická) vysvětluje 17,4 % variability. Barevné obrazce značí odlišné biotopy - suchý trávník (zelené kolečko); - opuštěné pole (oranžový čtverec), šedivá kolečka značí jednotlivé OTU.

4.2.3.3. Vliv rostlinných druhů na společenstvo AM hub - přímá CCA analýza

Podobnost rostlinných druhů ve složení společenstva AM hub je znázorněna na ordinačním diagramu parciální CCA analýzy (Obr. 22; a, b). Všechny kanonické osy parciální CCA analýzy s vysvětlující proměnnou „rostlinný druh“ a kovariátou „biotop“ vysvětlují 22,2 % variability (10,2 % při ošetření na počet stupňů volnosti; $F = 1,771$; $P = 0,002$). Rozložení druhů rostlin *A. cynanchica*, *G. verum*, *L. tenulifolium* a *S. varia*

na ordinačním diagramu naznačuje podobnost ve složení společenstva AM hub. Také u druhů *B. pinnatum*, *L. catharticum*, *S. recta*, *P. grandiflora* a *I. salicina* se projevuje určitá podobnost ve složení společenstva AM hub. Jak naznačuje zakroužkování, složení společenstva AM hub u těchto dvou skupin se lišilo (Obr. 22; a). Společenstvo AM hub u druhů *A. amellus* a *A. vulneraria* bylo značně odlišné od ostatních rostlinných druhů.

Taxonomická a ekologická (přítomnost či nepřítomnost na opuštěném poli) příslušnost rostlin nenaznačuje žádný trend v podobnosti složení společenstva AM hub (Obr. 22; a). Distribuce konkrétních OTU mezi druhy rostlin je naznačena na ordinačním diagramu (Obr. 22; b). Kromě OTU 2, které však bylo nalezeno jen v malé četnosti, ordinační diagram nenaznačuje specifickou distribuci OTU v rostlinných druzích.

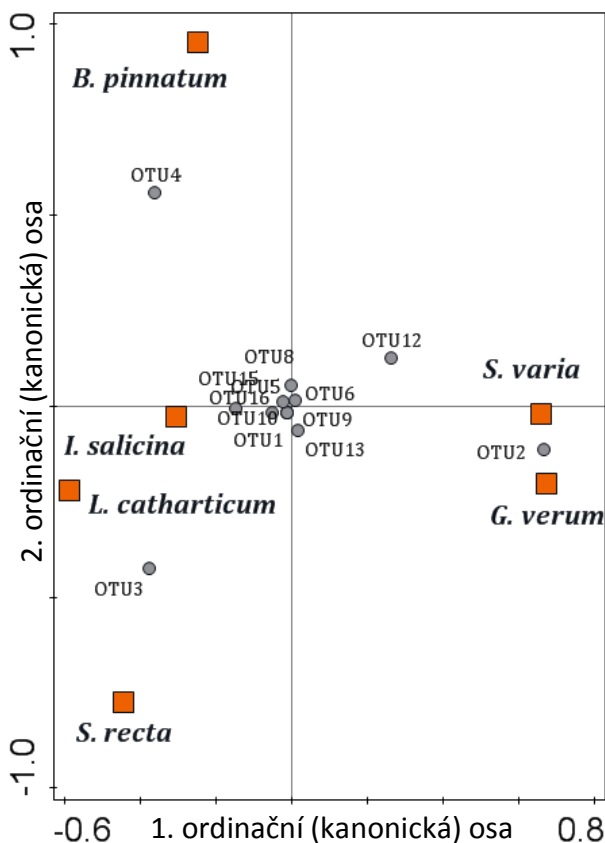


Obr. 22 (a, b): Ordinační diagram parciální CCA analýzy s vysvětlující proměnou "rostlinný druh" a kovariátou "biotop" znázorňující vzájemnou podobnost složení AM hub v jednotlivých rostlinných druzích ($F = 1,771$, $P = 0,002$). 1. ordinační osa (kanonická) vysvětluje 8,5 % variability, 2. ordinační osa (kanonická) 5,1 %, všechny kanonické osy vysvětlují 22,2 % variability (10,2 % při ošetření na počet stupňů

volnosti). Barevně odlišené symboly značí rostlinné druhy rostoucí pouze na suchém trávníku (zelený trojúhelník) a rostlinné druhy rostoucí na suchém trávníku i opuštěném poli (oranžový obdélník). Šedivá kolečka značí jednotlivé OTU. Propojení značí taxonomickou příbuznost druhů. Zakroužkování naznačuje podobnost druhů rostlin ve společenstvu AM hub.

Podobnost druhového složení AM hub v kořenech jednotlivých rostlinných druhů pouze z biotopu opuštěné pole je naznačena na ordinačním diagramu CCA analýzy s proměnnou „rostlinný druh“ (Obr. 23). Všechny kanonické osy vysvětlily 44,8 % variability (30,3 % při ošetření na počet stupňů volnosti; $F = 3,085$; $P = 0,002$). *B. pinnatum* se od ostatních rostlinných druhů odlišuje ve složení společenstva AM hub. Rostlinné druhy *S. varia* a *G. verum* jsou si blíže podobné ve složení společenstva AM hub, OTU 2 je pro tyto dva druhy na tomto biotopu specifický. Pro druhy *L. catharticum* a *S. recta* je charakteristický OTU 3. Ostatní OTU se vyskytují rovnoměrněji mezi rostlinnými druhy.

Model pro podobnost rostlinných druhů ve složení společenstva AM hub pouze z biotopu suchý trávník nebyl statisticky průkazný ($F = 1,186$; $P = 0,126$), proto zde není zobrazen. Také model, který zobrazoval vzájemnou interakci mezi rostlinnými druhy a biotopy nebyl statisticky průkazný ($F = 1,232$; $P = 0,168$).



Obr. 23: Ordinační diagram CCA analýzy s proměnnou „rostlinný druh“ ze vzorků pouze z biotopu opuštěné pole znázorňuje vzájemnou podobnost rostlinných druhů ve společenstvu AM hub ($F = 3,085$; $P = 0,002$). 1. ordinační osa (kanonická) vysvětlila 24,6 % variability a 2. ordinační osa (kanonická) vysvětlila 13,6 % variability, všechny kanonické osy dohromady vysvětlily 44,8 % variability (30,3 % při ošetření na počet stupňů volnosti). Oranžové čtverce značí rostlinné druhy a šedivá kolečka jednotlivá OTU.

5. DISKUZE:

Diskuze je rozdělena na tři podkapitoly, ve kterých jsou nejprve diskutovány zvlášť výsledky ze skleníkového nádobového experimentu a výsledky z charakteristiky společenstev AM hub na lokalitě. Syntéza výsledků z obou částí je předmětem třetí podkapitoly.

5.1. Diskuze skleníkového nádobového experimentu

Kolonizace kořenů AM houbami byla zjištěna u všech studovaných druhů rostlin. To ukazuje, že tyto druhy rostlin jsou schopné tvořit mykorhizní symbiózu. Je tedy patrné, že patří k méně či více mykorhizně závislým druhům, což je v souladu s jejich taxonomickým zařazením do čeledí Poaceae, Asteraceae a Lamiaceae, které nepatří mezi čeledě s převážně nemykotrofními druhy (shrnuto v Tester *et al.* (1987)).

Taxonomické páry rostlin měly poměrně podobnou míru kolonizaci kořenů, což může naznačovat, že kolonizace kořenů AM houbami je taxonomicky ovlivněna. Druhy *B. pinnatum* a *B. media*, které patří do čeledi Poaceae, měly výrazně nižší kolonizaci AM hub v kořenech než ostatní druhy. Kolonizace kořenového systému AM houbami může souviset s mykorhizní závislostí rostlinných hostitelů (Wilson & Hartnett, 1998). Uvádí se, že trávy s typem fotosyntézy C3 bývají spíše méně mykorhizně závislé (Hetrick *et al.*, 1988). Mykorhizní odpověď lze u těchto taxonů rostlin očekávat zvláště při nízké dostupné koncentraci fosforu v půdě (Baylis, 1975). Nižší závislost na mykorhizní symbióze může souviset s jejich rozsáhlým kořenovým systémem, který je tvořen silně rozvětvenými kořeny graminoidního typu pokrytými kořenovými vlásky, které účinně absorbují živiny z půdy i bez pomoci mykorhizní symbiózy (Baylis, 1975).

Kolonizace AM hub v kořenovém systému rostlin může korelovat s mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin (Zangaro *et al.*, 2007). Důvodem této korelace může být zvyšující se přenos živin přes rozsáhlejší mykorhizní struktury uvnitř kořene (shrnuto v Treseder, 2013). Korelační analýza přes všechny druhy studovaných rostlin potvrdila souvislost kolonizace AM hub v kořenech s mykorhizní odpovědí rostlin i v této práci. Konkrétně například druh *A. amellus* vykazoval velmi vysokou kolonizaci kořenů AM houbami a také jeho mykorhizní odpověď byla velmi vysoká. Naopak druh *B. media* měl nižší kolonizaci AM hub v kořenech a zároveň vykazoval výrazně nižší mykorhizní odpověď.

Míra kolonizace kořenů většinou nebyla ovlivněna původem půdy, ve které rostliny rostly. Abiotické faktory obou půd tedy pravděpodobně působily na rozvoj kolonizace kořenů AM houbami podobně - neprojevíly se dramatické rozdíly v podmínkách obou půd pro rozvoj mykorhizní symbiózy. Tato skutečnost je v souladu s výsledky práce Richter *et al.* (2002), kteří na třech lokalitách nezjistili rozdíly v kolonizaci kořenů AM houbami mezi přirozeným biotopem a v minulosti obhospodařovaným polem i přesto, že mykorhizní inokulační potenciál byl vyšší na opuštěném poli. Taxony AM hub se mohou lišit ve schopnosti kolonizovat kořeny hostitelských rostlin (Hart & Reader, 2002), avšak v podmínkách této studie společenstva AM hub, kterými byly inokulovány rostliny, vykazovala srovnatelnou schopnost kolonizace kořenů.

Lze tedy shrnout, že úroveň kolonizace kořenů AM houbami byla poměrně vysoká a konzistentní v rámci taxonomického páru, nižší kolonizace byla zjištěna v případě obou druhů z čeledi Poaceae, což může souviset s jejich nižší mykorhizní závislostí. Kolonizace kořenů AM houbami korelovala s mykorhizní odpovědí nadzemní biomasy rostlin.

Mykorhizní růstová odpověď se značně lišila mezi konkrétními druhy rostlin. Pozitivní mykorhizní odpověď znamená, že rostliny měly z mykorhizní symbiózy prospěch a mykorhizní symbióza tedy byla důležitá pro jejich růst. V tomto experimentu byla mykorhizní odpověď nadzemní biomasy vesměs v kladných číslech kromě druhů *B. media* a *S. recta* u jedné kombinace půdy a inokula. Mykorhizní odpověď nadzemní biomasy *A. amellus* dosahovala výrazně kladných hodnot (až 1200 %, což odpovídá tomu, že rostliny inokulované byly až 13 krát větší než nemykorhizní kontrolní rostliny). Také *P. grandiflora* měla velmi vysokou mykorhizní odpověď. Je tedy patrné, že pro tyto druhy je AM symbióza důležitá, což je v souladu s výsledky Pánkové *et al.* (2008) pro *A. amellus* a Streitwolf-Engel *et al.* (1997) pro *P. grandiflora*. Naopak u druhů *B. media* a *S. recta* byla mykorhizní odpověď nadzemní biomasy výrazně nižší až nulová. Z toho lze usuzovat, že pro růst druhu *B. media* a *S. recta* není mykorhizní symbióza v daných podmínkách podstatná. U druhu *B. media* je toto zjištění v souladu s obecně nižší mykorhizní závislostí trav (Hetrick *et al.*, 1988). Mykorhizní odpověď nadzemní biomasy může být také ovlivněna objemem půdy, ve kterém rostlina roste. S menším objemem půdy a vyšší hustotou kořenů v půdě se může snižovat i mykorhizní odpověď rostlin. Mykorhizní symbióza za těchto podmínek již nemusí mít tak velký význam pro příjem živin z půdy (Zhu *et al.*, 2001).

Mimokořenové mycelium je důležité pro příjem fosforu a zlepšuje jeho příjem hostitelskou rostlinou se zvyšujícím se rozsahem (Jakobsen *et al.*, 1992). Mimokořenové mycelium je důležité pro rostliny v příjmu živin právě pro svůj rozsah do míst, které již nejsou kolonizovány kořeny rostlin a kde proto ještě nejsou vyčerpané dostupné živiny. Rostliny byly v experimentu pěstovány v nádobách o stejném objemu půdy, avšak jednotlivé druhy rostlin se lišily ve velikosti svého kořenového systému. Rostliny z čeledi Poaceae mají rozsáhlejší kořenový systém než ostatní druhy, mohly jim prostoupit celý objem půdy v nádobě a to mohlo snížit jejich mykorhizní odpověď v těchto podmínkách (Baylis, 1975).

Různé druhy rostlin se lišily v mykorhizní odpovědi i přesto, že byly inokulovány stejným společenstvem AM hub. Je tedy očividné, že mykorhizní odpověď byla především ovlivněna identitou hostitelských rostlin a jejich taxonomickým či funkčním zařazením. Výsledky jsou tak v souladu s metastudií Hoeksema *et al.* (2010) a prací Reinhart *et al.* (2012). Naopak vliv identity společenstva AM hub byl v tomto případě malý, což je v rozporu s pracemi, které ukazují závislost mykorhizní odpovědi na identitě symbiontů (Thonar *et al.*, 2014). Je však možné, že se společenstva AM hub ze suchého trávníku a opuštěného pole mezi sebou příliš nelišila. Pouze růstová odpověď *S. recta* a *P. grandiflora* byla částečně větší se společenstvem AM hub z opuštěného pole než ze suchého trávníku. Je možné, že ve společenstvu z opuštěného pole se objevily určité taxony AM hub, které se nenalézají nebo jsou jen v menší míře zastoupeny na půdě ze suchého trávníku, a mohou být specificky prospěšné rostlinám z čeledi Lamiaceae.

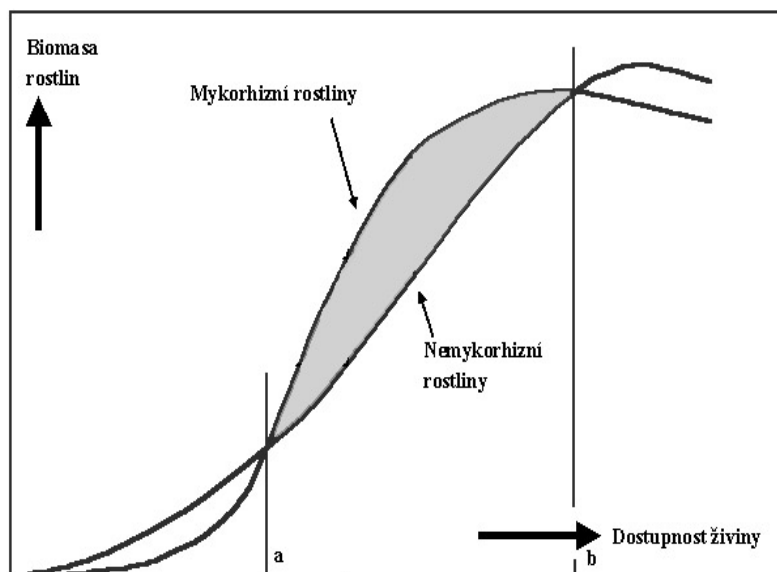
U mykorhizní odpovědi kořenové biomasy byl vliv inokulace odlišným původem společenstva AM hub patrnější. Kořeny rostlin mohou být zřejmě citlivější na společenstvo AM hub v kořenech než nadzemní části rostlin. Spolu s mykorhizním inokulem mohla být do nádobových experimentů vnesena i další mikrobiální společenstva. Mikrobiální společenstva jsou v přímém kontaktu s kořenovým systémem rostlin, čímž mohla ovlivňovat více jejich odpovědi na inokulum než odpověď nadzemní části rostlin. Avšak nebyl zde viditelný žádný konzistentní vliv původu inokula. Konkrétní rostlinné druhy v kombinaci s určitým společenstvem AM hub mohou zřejmě vytvářet odlišnou mykorhizní odpověď kořenové biomasy v závislosti na kombinaci rostlinný druh - společenstvo AM hub (Sharma *et al.*, 2009).

Souhrnně vzato byla mykorhizní růstová odpověď pozitivní, rostliny měly prospěch z mykorhizní symbiózy. Mykorhizní odpověď *A. amellus* a *P. grandiflora*

byla velmi vysoká. Lze tedy usuzovat, že tyto druhy rostlin patří k vysoce mykorhizně závislým rostlinným druhům. Inokulace rozdílným původem společenstva AM hub neměla na růst rostlin významný vliv. Kořenová biomasa byla k původu inokula poněkud citlivější než nadzemní biomasa

Nadzemní i kořenová biomasa rostlin byla významně ovlivněna původem půdy. Rostliny obecně lépe prospívaly v půdě ze suchého trávníku než v půdě z opuštěného pole nezávisle na inokulaci. Také mykorhizní odpověď nadzemní biomasy rostlin byla výrazně ovlivněna původem půdy. Obecně měly rostliny pěstované v půdě z opuštěného pole vyšší mykorhizní odpověď než rostliny pěstované v půdě ze suchého trávníku. U *P. grandiflora* se tento trend uplatnil významným způsobem, rostliny rostoucí na opuštěném poli měly mykorhizní odpověď nadzemní biomasy až 1200 %, kdežto rostliny rostoucí na půdě ze suchého trávníku měly mykorhizní odpověď pouze okolo 100 %. Lze usuzovat, že mykorhizní symbióza je významnější pro růst rostlin na opuštěném poli než na suchém trávníku. Lepší růst rostlin v půdě ze suchého trávníku naopak ukazuje na vliv některé z abiotických složek půdy nezávisle na vlivu mykorhizní symbiózy. V práci Corkidi *et al.* (2002) bylo uvedeno, že rostliny lépe rostou v půdě se zvýšenou koncentrací dusíku bez ohledu na mykorhizní symbiózu, účinnost mykorhizní symbiózy může být v půdě s vyšší koncentrací dusíku snížena. Koncentrace dusíku v půdě ze suchého trávníku byla významně vyšší než koncentrace dusíku na opuštěném poli, což mohlo mít vliv na růst rostlin a účinnost mykorhizních hub. Rostliny také mohly přímo získávat více dusíku z půdy ze suchého trávníku pro svůj metabolismus a tím výrazně zlepšovat svůj růst bez ohledu na mykorhizní symbiózu.

Naměřená koncentrace dostupného fosforu v půdě z opuštěného pole byla vyšší než v půdě ze suchého trávníku, avšak rozdíl nebyl nikterak výrazný. Přesto mohly být mykorhizní houby v půdě s mírně zvýšenou koncentrací dostupného fosforu účinnější (Obr. 24) (Bethlenfalvay *et al.*, 1983). Ale jistě zde budou hrát roli i další faktory půdy než je pouze dostupnost živin. Může se jednat zejména například o zvýšený obsah organické hmoty na suchém trávníku (Johnson, 1998) nebo o strukturu půdy, která byla kompaktnější v případě půdy z opuštěného pole (Nadian *et al.*, 1997).



Ob. 24: Biomasa mykorhizních a nemykorhizních rostlin při gradientu dostupnosti živin. Šedá oblast vymezuje rozsah, kdy mykorhizní rostliny mají prospěch nad nemykorhizními (Převzato z Gryndlera *et al.* (2004)).

Souhrnně lze tedy říct, že nadzemní i kořenová biomasa byla ovlivněna původem půdy, ve které rostliny rostly. Větší biomasu měly rostliny pěstované v půdě ze suchého trávníku. Naopak mykorhizní růstová odpověď byla větší na půdě z opuštěného pole. Mykorhizní symbióza byla tedy pro rostliny významnější na opuštěném poli.

Různé druhy rostlin se mezi sebou liší koncentrací fosforu v biomase (shrnuto v Reich *et al.*, 2004). Ve skleníkovém experimentu byly patrné poměrně velké rozdíly v koncentraci fosforu mezi taxonomickými páry. Tyto rozdíly mohou souviset s taxonomicky danou potřebou fosforu konkrétního druhu či taxonu rostlin. Rostlinné druhy vykazovaly kladnou mykorhizní odpověď v koncentraci fosforu kromě druhu *I. salicina*, u kterého se inokulované a nemykorhizní varianty v koncentraci fosforu nelišily, a druhu *A. amellus*, který měl naopak zápornou mykorhizní odpověď. Tato záporná mykorhizní odpověď v příjmu fosforu na jednotku biomasy může být částečně vysvětlitelná i nízkým počtem opakování v nemykorhizní variantě u *A. amellus* díky vysoké mortalitě nemykorhizních rostlin. Nemykorhizní vzorky nadzemní biomasy tohoto druhu také měly velmi nízkou hmotnost, kvůli které mohou být výsledky z této varianty, ke kterým se vztahuje výpočet mykorhizní odpovědi, málo přesné. U obou druhů však byl, díky výrazné pozitivní růstové odpovědi na mykorhizu, celkový obsah fosforu v nadzemní biomase výrazně vyšší v inokulovaných variantách než bez inokulace. Je tedy patrné, že i u těchto rostlin AM houby zlepšily příjem fosforu

(Smith & Read, 1997) a dokonce lze předpokládat, že fosfor byl limitujícím prvkem pro růst *A. amellus* a mykorhiza pomohla tuto limitaci překonat. U druhů *B. media* a *S. recta* byla situace přesně opačná. U *B. media* a *S. recta* mykorhizní symbióza podporovala výrazně příjem fosforu na jednotku biomasy, avšak mykorhizní odpověď nadzemní biomasy byla jen velmi slabě pozitivní. Je tedy pravděpodobné, že růst rostlin byl limitován jiným faktorem než fosforem. Zvýšený příjem fosforu díky mykorhize vedl k zvýšení koncentrace tohoto prvku v pletivech.

Koncentrace fosforu na jednotku nadzemní biomasy rostlin byla obecně vyšší u rostlin rostoucích v půdě z opuštěného pole, což je v souladu s vyšší dostupnou koncentrací fosforu v půdě z opuštěného pole než v půdě ze suchého trávníku dle půdních analýz. Rostliny rostoucí v půdě s vyšší koncentrací dostupného fosforu mohou mít vyšší koncentraci tohoto prvku nadzemní biomase nejen v nemykorhizních, ale i v mykorhizních variantách (McArthur & Knowles, 1993b). Je však zajímavé, že v našem experimentu se rostliny nemykorhizních variant v koncentraci fosforu v nadzemní biomase mezi půdami nelišily - lišily se pouze varianty inokulované. Je tedy možné, že mykorhizní houby mohou lépe podpořit příjem fosforu hostitelskou rostlinou v půdě s vyšší dostupnou koncentrací tohoto prvku v souladu s prací Johnson (1998).

Vliv původu společenstva AM hub na koncentraci fosforu v nadzemní biomase se projevil pouze u druhu *B. pinnatum* a *S. recta*, avšak nebyl zde patrný konzistentní trend rozdílů mezi společenstvy AM hub. Koncentrace fosforu v nadzemní biomase rostlin byla tedy ovlivněna zejména původ půdy a dále pak inokulací AM houbami nezávisle na původu inokula. Můj pokus tedy nepotvrdil výsledky některých prací, které uvádějí, že původ inokula může mít vliv na koncentraci fosforu v nadzemní biomase (Moora *et al.*, 2004; Pasqualini *et al.*, 2007). Je tedy možné, že inokula ze suchého trávníku a opuštěného pole se příliš nelišila společenstvem AM hub nebo jeho vlastnostmi.

Lze tedy shrnout, že mykorhizní odpověď na koncentraci fosforu byla vesměs pozitivní, kromě druhů *A. amellus* a *I. salicina*, které měly mykorhizní odpověď nulovou nebo zápornou. Celkový obsah fosforu na rostlinu byl však u těchto druhů v mykorhizních variantách podstatně vyšší. Koncentrace fosforu v nadzemní biomase byla obecně vyšší u rostlin pěstovaných v půdě z opuštěného pole, avšak nemykorhizní varianty se mezi oběma půdami v koncentraci fosforu nelišily. Je tedy pravděpodobné, že mykorhizní symbióza byla účinnější v příjmu fosforu v půdě s jeho vyšší dostupnou

koncentrací. Původ společenstva AM hub neměl na koncentraci fosforu žádný konzistentní vliv.

Mykorhizní odpovědi rostlinných druhů rostoucích pouze na suchém trávníku a druhů rostoucích na suchém trávníku i opuštěném poli nebyly konzistentně odlišné. Výsledky tedy nenaznačují, že by se na neschopnosti některých druhů rostlin kolonizovat opuštěné pole podílela mykorhizní symbióza.

5.2. Společenstva AM hub na lokalitě

Na lokalitě byly nalezeny sekvence 17 různých OTU. V kořenových vzorcích analyzovaných metodou T-RFLP bylo detekováno pouze 14 OTU. Nebyly nalezeny OTU 7 (*F. mosseae*), OTU 11 (*Scutellospora* sp.) a OTU 17 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Paraglomeraceae). Taxony z čeledi Paraglomeraceae (OTU 17) bývají jen zřídka detekovány v kořenech rostlin a to i na lokalitách, kde jsou relativně hojně nacházeny v půdních vzorcích (Hempel *et al.*, 2007). Také *Scutellospora* sp. z čeledi Gigasporaceae (OTU11) patří k taxonům, které jsou detekovány spíše ze vzorků půd či spor než z kořenových systémů (Hart & Reader, 2002; Hempel *et al.*, 2007). *F. mosseae* patří spíše k hojnějším taxonům, ale například v rozsáhlé studii založené na 454 sekvenování (Öpik *et al.*, 2009) rovněž nalezen nebyl, což znamená, že na některých lokalitách může být zastoupen minoritně či vůbec.

9 z 14 OTU zjištěných pomocí T-RFLP patří do čeledi Glomeraceae, což potvrzuje dříve popsanou dominanci této čeledi ve společenstvech AM hub (Hijri *et al.*, 2006; Lumini *et al.*, 2009). Čeleď Glomeraceae je globálně rozšířenou čeledí s vysokým počtem taxonů a vysokou frekvencí výskytu (Öpik *et al.*, 2009; Öpik *et al.*, 2010). Může to být dáno vlastnostmi této skupiny, která je schopná rychle kolonizovat kořenové systémy rostlin z kolonizovaných fragmentů kořenů v půdě (Hart & Reader, 2002) a vyznačuje se obecně vysokou odolností k abiotickým stresům (Daniell *et al.*, 2001; Oehl *et al.*, 2003; Lumini *et al.*, 2009). Největší frekvenci v zastoupení AM hub v kořenových systémech měly OTU 1 patřící k taxonu *R. irregularis* a OTU 10 (blíže neidentifikovaný taxon z čeledi Glomeraceae). Tyto taxony byly zastoupeny v téměř 100 % kořenových vzorcích. Také další zástupci z čeledi Glomeraceae měly vysokou frekvenci výskytu ve vzorcích.

Druhová bohatost AM hub v kořenech rostlin rostoucích na obou biotopech byla prokazatelně, i když jen mírně vyšší na opuštěném poli než na suchém trávníku. Zdá se tedy, že historie biotopu opuštěného pole na této lokalitě neměla na druhovou bohatost

AM hub v kořenech vliv, ačkoli zemědělství obecně může značně ovlivňovat druhovou bohatost AM hub. Orba, intenzivní hnojení či pěstování monokultur může snižovat počet AM hub nebo selektovat takové taxony AM hub, které odolávají vyvolanému stresu (Johnson & Pflieger, 1992) a tím snižovat diverzitu společenstev. Přesto některé studie naznačují, že diverzita AM hub na obhospodařovaných polích nemusí být nutně vždy nízká (Hijri *et al.*, 2006).

Je zajímavé, že frekvence výskytu jednotlivých OTU byla vyšší ve vzorcích z biotopu opuštěného pole než ve vzorcích z biotopu suchého trávníku kromě OTU 3 a OTU 4. Zemědělské obhospodařování půdy způsobuje širokou škálu stresů, které mohou ovlivnit frekvenci výskytu AM hub, případně mohou působit jako selekční tlak pouze na některé taxony AM hub (Jansa *et al.*, 2002), které pak mohou frekvenčně převládnout nad ostatními a vést k frekvenčně nevyváženému společenstvu AM hub. Avšak zdá se, že v tomto případě tomu tak není. Na opuštěném poli pravděpodobně panují příhodné abiotické nebo biotické podmínky pro AM houby, které umožnily vznik srovnatelně bohatého společenstva jako na polopřirozeném suchém trávníku.

Po skončení zemědělského využívání plochy mohlo dojít k rychlému obnovení diverzity společenstva AM hub na biotopu. Spory AM hub se na biotop mohly rozšířit ze sousedních biotopů nebo obnovit ze spor v půdě, které přetrvaly nepříznivé podmínky. Rozšíření spor z okolních biotopů může probíhat poměrně rychlým způsobem (Püschel *et al.*, 2007b). Překvapivě může při obnovování společenstev AM hub ze zásobního inokula v půdě po disturbanci, která narušila myceliální síť, dojít ke zvýšení diverzity AM hub v kořenech rostlin (Johnson *et al.*, 2004). Lze tedy usuzovat, že v minulosti na opuštěném poli neprobíhalo příliš intenzivní zemědělství, které by poškodilo zásobní inokulum v půdě nebo se podmínky na opuštěném poli mohly již přirozeně obnovit a postupně se dostat do stavu podobného, jaký panuje na přilehlém polopřirozeném trávníku. OTU 14 patřící k taxonu *Archaeospora sp.* byla nalezena pouze na biotopu opuštěné pole, i když ve velmi nízké frekvenci. Je pravděpodobné, že tento taxon patří mezi hůře detekovatelné taxony AM hub v kořenech rostlin a také mezi vzácnější taxony AM houby, které vyžadují určité podmínky pro své rozšíření (Hijri *et al.*, 2006; Lumini *et al.*, 2009). To, že tento taxon byl nalezen na opuštěném poli, rovněž naznačuje, že současné podmínky na opuštěném poli jsou příhodné pro společenstva AM hub.

Souhrnně vzato bylo nalezeno 17 OTU na lokalitě, některé OTU následně nebyly detekovány metodou T-RFLP v kořenových vzorcích, což může souviset s jejich nízkou

abundancí v kořenech. Nejvíce nalezených OTU patřilo do široce rozšířené čeledi Glomeraceae. Do této čeledi patřily i OTU, které se na lokalitě vyskytovaly s nejvyšší frekvencí. Druhá bohatost AM hub byla vyšší na opuštěném poli, nicméně ne výrazným způsobem. Obecně také frekvence jednotlivých OTU v kořenových systémech byla vyšší na biotopu opuštěné pole než na biotopu suchý trávník. Společenstva AM hub na obou biotopech byla poměrně vyvážená. Výsledky tak ukazují, že na biotopu opuštěného pole nepanují pro AM houby horší podmínky než na biotopu suchého trávníku. Případný negativní vliv zemědělského využívání plochy v minulosti tedy do současnosti nepřetrvává.

Společenstva AM hub na lokalitě se mohou dynamicky měnit a vyvíjet a jsou ovlivňována abiotickými a biotickými faktory, které se na lokalitě vyskytují. Z ordinačního diagramu DCA analýzy (Obr. 20; a) lze vyčíst určitý vliv biotopu na složení AM hub v kořenech rostlin, který byl ověřen přímou CCA analýzou. Z abiotických faktorů, které obecně působí na společenstva AM hub, mohla být významná rozdílná koncentrace živin v půdách obou biotopů. Určitá hladina živin může upřednostňovat rozvoj taxonů, kterým dané podmínky vyhovují či jsou generalisti, a naopak může docházet k potlačení taxonů, které jsou specializované na jiné podmínky prostředí (Egerton-Warburton & Allen, 2000). Nejen živiny v půdě (Toljander *et al.*, 2008), ale i další abiotické i biotické faktory jako např. gradient pH (An *et al.*, 2008), společenstva rostlin na lokalitě (Mummey *et al.*, 2005) či interakce s jinými organismy (Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2009) mohou ovlivnit složení společenstva AM hub.

Přestože se o AM symbióze často hovoří jako o hostitelsky nescifické interakci (Santos *et al.*, 2006), četné studie ukázaly, že hostitelské rostliny vyskytující se na jedné lokalitě mohou mít v kořenech odlišná společenstva AM hub (Helgason *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Wubet *et al.*, 2006a). Např. v práci Sýkorové *et al.* (2007) se dva blízké příbuzné druhy rostlin (*Gentiana verna* a *G. acaulis*) lišily ve složení společenstva AM hub. Naopak v práci Öpik *et al.* (2003) bylo zjištěno podobné společenstvo AM hub u dvou druhů rodu *Pulsatilla* rostoucích na stejném biotopu. V naší studii si byly některé druhy rostlin na lokalitě více či méně podobné ve složení společenstva AM hub, avšak nebyl patrný vliv taxonomické či ekologické příslušnosti rostlin na složení společenstva AM hub (Obr. 20; b, Obr. 22; a). V pracích Öpik *et al.* (2009) a Davison *et al.* (2011) byl naopak vliv ekologického zařazení rostlin na společenstva AM hub výrazný a převyšoval vliv taxonomické

příslušnosti. Nicméně tyto výsledky byly získány pomocí 454 sekvenování, které zachytilo i druhy, jejichž frekvence výskytu byla pod detekčním limitem námi zvolených přístupů (Sangerovské sekvenování databáze klonů, T-RFLP). Převážně právě v těchto druzích se odlišovala společenstva AM hub v kořenech rostlin generalistů a specialistů.

Dramatické rozdíly ve složení společenstev AM hub mezi druhy rostlin mnohorozměrné analýzy tedy nenaznačily, naopak se v analýzách objevoval zřetelnější vliv biotopu na složení společenstev AM hub. Je tedy pravděpodobné, že složení společenstev AM hub je více ovlivňováno biotopem než rostlinným hostitelem, což je zdokumentováno i v práci Li *et al.* (2010), kde rostlinné druhy v jednom biotopu hostily rozdílná společenstva AM hub, ale ještě více se společenstva AM hub v kořenech odlišovala mezi dvěma biotopy. Také v práci Dumbrell *et al.* (2010) měl vliv podmínek na biotopu podstatný vliv na složení společenstev AM hub v kořenech rostlin, vliv hostitelské rostliny byl zanedbatelný.

5.3. Syntéza výsledků skleníkového nádobového experimentu s poznatky o složení společenstev AM hub na lokalitě

Ve skleníkovém nádobovém experimentu byla mykorhizní symbióza významná pro růst rostlin v půdě z obou biotopů. Také vysoká druhová bohatost AM hub byla nalezena v obou biotopech. Z výsledků je patrné, že mykorhizní symbióza je důležitou součástí obou biotopů. A také, že na mykorhizní symbiózu nepůsobí na opuštěném poli nepříznivé vlivy z předchozích obhospodařování.

Původ společenstev AM hub neměl příliš velký význam pro růst vybraných druhů rostlin ve skleníkovém experimentu. Je proto pravděpodobné, že společenstva AM hub se mezi biotopy neliší do té míry, že by se jejich rozdílnost mohla projevit při růstu rostlin nebo složení společenstev AM hub nemusí být příliš významné pro růst vybraných druhů rostlin. Je však také možné, že společenstva AM hub, která se nacházejí v kořenech pokusných rostlin, se mohou lišit od společenstev detekovaných v kořenových vzorcích z lokality.

Rozdíly v mykorhizních odpovědích rostlin byly konzistentně taxonomicky vázané, avšak společenstva AM hub v kořenech rostlin z lokality taxonomickou příslušností hostitele ovlivněná nebyla. Z výsledků je tedy patrné, že rostlinné druhy

na lokalitě pravděpodobně nevstupují do specifických vztahů s určitými taxony AM hub, ačkoli na mykorhizní symbiózy odpovídají odlišně. Rostliny, rozděleny podle ekologických nároků na ty, co rostou na suchém trávníku a opuštěném poli a na ty, co opuštěné pole nekolonizují, se konzistentně nelišily v mykorhizních odpovědích ani ve složení společenstev AM hub. Je tedy pravděpodobné, že specifické nároky na mykorhizní symbiózu nejsou důvodem, proč některé druhy rostlin nejsou schopné kolonizovat opuštěné pole.

6. SOUHRN

Diplomová práce byla zaměřena na studium významu AM symbiózy pro růst vybraných druhů rostlin ve dvou biotopech. Účelem této diplomové práce bylo podpořit či vyvrátit hypotézu, že některé rostlinné druhy ze suchého trávníku nekolonizují opuštěné pole z důvodu odlišného společenstva AM hub v tomto biotopu.

Na základě získaných výsledků ze skleníkového nádobového pokusu a molekulárního stanovení společenstev AM hub na lokalitě lze usoudit, že stanovená hypotéza nebyla podpořena. Předem stanové dílčí otázky lze zodpovědět následovně:

1. Liší se rostlinné druhy schopné kolonizovat opuštěné pole v závislosti na AM symbióze od druhů, které opuštěné pole nekolonizují?

Rostlinné druhy, které jsou schopné kolonizovat opuštěné pole, se konzistentně nelišily v závislosti na AM symbióze od druhů, které rostou na suchém trávníku. Rozdíly v závislosti na AM symbióze byly vázané taxonomicky.

2. Liší se mykorhizní odpověď těchto rostlinných druhů v půdě ze suchého trávníku a z opuštěného pole, a závisí na tom, zda je mykorhiza tvořena společenstvem AM hub z jednoho či druhého biotopu?

Byl pozorován poměrně konzistentní trend lepšího růstu rostlin v půdě ze suchého trávníku, avšak mykorhizní růstová odpověď byla vyšší na opuštěném poli. Lze tedy usuzovat, že AM symbióza byla významnějším faktorem ovlivňující růst rostlin na biotopu opuštěného pole než na suchém trávníku. Nebyly však zjištěny funkční rozdíly mezi společenstvy AM hub obou biotopů.

3. Liší se složení společenstev AM hub ze suchého trávníku a z opuštěného pole?

Složení společenstev AM hub bylo ovlivněno biotopem. Přestože opuštěné pole bylo v minulosti intenzivně zemědělsky obhospodařováno, společenstva AM hub na tomto biotopu měla mírně vyšší průměrnou druhovou bohatost na kořenový systém a vyšší frekvenci jednotlivých taxonů AM hub ve vzorcích. Je pravděpodobné, že v době uplynulé od opuštění pole před 20 lety již došlo k přirozené obnově společenstev AM hub.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aldrich-Wolfe L. 2007. Distinct mycorrhizal communities on new and established hosts in a transitional tropical plant community. *Ecology* **88**: 559–566.

Allen MF, Hipps LE, Wooldridge GL. 1989. Wind dispersal and subsequent establishment of VA mycorrhizal fungi across a successional arid landscape. *Landscape Ecology* **2**: 165–171.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer a a, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**: 3389–3402.

An G-H, Miyakawa S, Kawahara A, Osaki M, Ezawa T. 2008. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pioneer grass species *Miscanthus sinensis* in acid sulfate soils: Habitat segregation along pH gradients. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**: 517–528.

Antunes PM, Koch AM, Dunfield KE, Hart MM, Downing A, Rillig MC, Klironomos JN. 2008. Influence of commercial inoculation with *Glomus intraradices* on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. *Plant and Soil* **317**: 257–266.

Avio L, Pellegrino E, Bonari E, Giovannetti M. 2006. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist* **172**: 347–357.

Bartha S, Meiners SJ, Pickett STA, Cadenasso ML, Scott J, Steward TA, Mary L. 2003. Plant colonization windows in a mesic old field succession. *Applied Vegetation Science* **6**: 205–212.

Baylis GTS. 1975. Magnolioid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. *Endomycorrhizas; Proceedings of a Symposium*.

Bethlenfalvay G, Bayne HG, Pacovsky RS. 1983. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: The effect of phosphorus on host plant-endophyte interactions. *Physiologia Plantarum* **57**: 543–549.

Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA, Schultz A. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *Journal of Ecology* **84**: 71–82.

Boddington CL, Dodd JC. 2000. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi . I . Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and Soil* **218**: 137–144.

Boyle-Yarwood SA, Bottomley PJ, Myrold DD. 2008. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils under stands of red alder and Douglas fir in Oregon. *Environmental microbiology* **10**: 2956–2965.

- Brundrett MC, Piche Y, Peterson RL. 1984.** A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* **62**: 2128–2134.
- Brussaard L, Bakker JP, Olf H. 1996.** Biodiversity of soil biota and plants in abandoned arable fields and grasslands under restoration management. *Biodiversity and Conservation* **5**: 211–221.
- Bukovská P, Jelínková M, Hrselová H, Sýkorová Z, Gryndler M. 2010.** Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G+C nucleotide content and secondary structure melting point. *Journal of microbiological methods* **82**: 223–228.
- Burrows RL, Pflieger FL. 2002.** Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany* **80**: 120–130.
- Carbajo V, den Braber B, van der Putten WH, De Deyn GB. 2011.** Enhancement of late successional plants on ex-arable land by soil inoculations. *PloS one* **6**: e21943.
- Corkidi L, Rowland DL, Johnson NC, Allen EB. 2002.** Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands. *Plant and Soil* **240**: 299–310.
- Cousins S a. O, Lindborg R. 2008.** Remnant grassland habitats as source communities for plant diversification in agricultural landscapes. *Biological Conservation* **141**: 233–240.
- Cramer VA, Hobbs RJ, Standish RJ. 2008.** What's new about old fields? Land abandonment and ecosystem assembly. *Trends in Ecology & Evolution* **23**: 104–112.
- da C Jesus E, Marsh TL, Tiedje JM, de S Moreira FM. 2009.** Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal* **3**: 1004–1011.
- Daniell TJ, Husband R, Fitter a H, Young JPW. 2001.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 203–209.
- da Silva GA, Lumini E, Maia LC, Bonfante P, Bianciotto V. 2006.** Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* **16**: 183–9.
- Davison J, Öpik M, Daniell TJ, Moora M, Zobel M. 2011.** Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS icrobiology Ecology* **78**: 103–115.
- De Corte D, Yokokawa T, Varela MM, Agogué H, Herndl GJ. 2009.** Spatial distribution of Bacteria and Archaea and amoA gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. *The ISME Journal* **3**: 147–158.

- Dickie IA, FitzJohn RG. 2007.** Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza* **17**: 259–270.
- Dickie IA, Xu B, Koide RT. 2002.** Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* **156**: 527–535.
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C, Fitter AH. 2010.** Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* **4**: 337–345.
- Egerton-Warburton LM, Allen EB. 2000.** Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* **10**: 484–496.
- Ellenberg H, Strutt GK. 1988.** Vegetation ecology of central Europe. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Eschen R, Müller-Schärer H, Schaffner U. 2009.** Aboveground environment type, soil nutrient content and arbuscular mycorrhizal fungi explain establishment success of *Centaurea jacea* on ex-arable land and in late-successional grasslands. *Plant and Soil* **322**: 115–123.
- Ezawa T, Yamamoto K, Yoshida S. 2000.** Species composition and spore density of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under different conditions of P-fertility as revealed by soybean trap culture. *Soil Science and Plant Nutrition* **46**: 291–297.
- Fagan KC, Pywell RF, Bullock JM, Marrs RH. 2008.** Do restored calcareous grasslands on former arable fields resemble ancient targets? The effect of time, methods and environment on outcomes. *Journal of Applied Ecology* **45**: 1293–1303.
- Fisher MM, Triplett EW. 1999.** Automated approach for ribosomal intergenic spacer Aanalysis of microbial diversity and its ypplication to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4630–4636.
- Fitzjohn RG, Dickie IA. 2007.** TRAMPR: AN R package for analysis and matching of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) profiles. *Molecular Ecology Notes* **7**: 583–587.
- Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ. 2006.** Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* **170**: 381–390.
- Giovannetti M, Azzolini D, Silvia A. 1999.** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5571–5575
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP. 2001.** The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **151**: 717–724.

Gryndler M, Baláž M, Hršelová H, Jansa J, Vosátka M. 2004. Mykorhizní symbióza. O soužití hub s kořeny rostlin. *Academia*, Praha.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.

Harley JL. 1969. The biology of mycorrhiza. 2nd edition. *Leonardhill*, London.

Hart MM, Reader RJ. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **153**: 335–344.

Hayman DS, Tavares M. 1985. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XV. Influence of soil pH on the symbiotic efficiency of different endophytes. *New Phytologist* **100**: 367–377.

Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *British Ecological Society* **90**: 371–384.

Hempel S, Renker C, Buscot F. 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* **9**: 1930–1938.

Hetrick BD, Kitt DG, Wilson GT. 1988. Mycorrhizal dependence and growth habit of warm-season and cool-season tallgrass prairie plants. *Canadian Journal of Botany* **66**: 1376–1380.

Hijri I, Sýkorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Redecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* **15**: 2277–2289.

Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring C a, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, et al. 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* **13**: 394–407.

Chýlová T, Müenzbergová Z. 2008. Past land use co-determines the present distribution of dry grassland plant species. *Preslia* **80**: 183–198.

Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of P over defined distances. *New Phytologist* **120**: 509–516.

Jakobsen I, Rosendahl L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115**: 77–83.

Janos DP. 1980. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica* **12**: 56–64.

Janos DP. 2007. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* **17**: 75–91.

Janoušková M, Seddas P, Mrnka L, van Tuinen D, Dvořáčková A, Tollot M, Guaninazzi-Pearson V, Vosátka M, Gollotte A. 2009. Development and activity of *Glomus intraradices* as affected by co-existence with *Glomus claroideum* in one root system. *Mycorrhiza* **19**: 393–402.

Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* **12**: 225–234.

Johnson NC. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* **3**: 749–757.

Johnson NC. 1998. Responses of *Salsola kali* and *Panicum virgatum* to mycorrhizal fungi phosphorus and soil organic matter: implications for reclamation. *Journal of Applied Ecology* **35**: 86–94.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* **135**: 575–585.

Johnson NC, Pflieger FL. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stress. V: Bethlenfalvay *et al.* (eds.): Mycorrhizae in sustainable agriculture. *American Society of Agronomy*, Madison, **54**: 71–99.

Johnson D, Vandenkoornhuysen PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, Grime JP, Young JPW, Read DJ. 2004. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* **161**: 503–515.

Johnson NC, Wilson GWT, Bowker MA, Wilson JA, Miller RM. 2010. Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2093–2098.

Johnson NC, Zak DR, Tilman D, Pflieger FL, Url S. 1991. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia* **86**: 349–358.

Jumpponen A, Trowbridge J, Mandyam K, Johnson L. 2005. Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonization but shifts community composition - evidence from rDNA data. *Biology and Fertility of Soils* **41**: 217–224.

Kaplan CW, Kitts CL. 2003. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 121–125.

Klironomos JN. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecological Society of America* **84**: 2292–2301.

- Klironomos JN, Moutoglis P. 1999.** Colonization of nonmycorrhizal plants by mycorrhizal neighbours as influenced by the collembolan, *Folsomia candida*. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 277–281.
- Knappová J, Hemrová L, Münzbergová Z. 2012.** Colonization of central European abandoned fields by dry grassland species depends on the species richness of the source habitats: a new approach for measuring habitat isolation. *Landscape Ecology* **27**: 97–108.
- Koch AM, Croll D, Sanders IR. 2006.** Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letters* **9**: 103–110.
- Koide RT. 2000.** Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis - Commentary. *New Phytologist* **147**: 233–235.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüssler A. 2012.** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* **193**: 970–984.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüssler A. 2009.** DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **183**: 212–223.
- Landis FC, Gargas A, Givnish TJ. 2004.** Relationships among arbuscular mycorrhizal fungi, vascular plants and environmental conditions in oak savannas. *New Phytologist* **164**: 493–504.
- Lanfranco L, Delpero M, Bonfante P. 1999.** Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* **8**: 37–45.
- Lekberg Y, Koide RT, Rohr JR, Aldrich-Wolfe L, Morton JB. 2007.** Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* **95**: 95–105.
- Lendenmann M, Thonar C, Barnard RL, Salmon Y, Werner RA, Frossard E, Jansa J. 2011.** Symbiont identity matters: carbon and phosphorus fluxes between *Medicago truncatula* and different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **21**: 689–702.
- Lepš J, Šmilauer P. 2003.** Multivariate analysis of ecological data using CANOCO. *Cambridge University Press*, New York.
- Levene H. 1960.** Robust tests for equality of variances¹. V: Olkin *et al.* (eds.) Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling. *Stanford University Press*, Stanford: 278-291
- Li L-F, Li T, Zhang Y, Zhao Z-W. 2010.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 418–427.

Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, Trumbore SE, Högberg P, Stenlid J, Finlay RD. 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* **173**: 611–620.

Liu W, Marsh TL, Cheng H. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522

Lukow T, Dunfield P, Liesack W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology* **32**: 241–247.

Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, Bonfante P, Bianciotto V. 2009. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology* **12**: 2165–2179.

Mangan S, Adler G. 2002. Seasonal dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi by spiny rats in a neotropical forest. *Oecologia* **131**: 587–597.

McArthur DAJ, Knowles NR. 1993a. Influence of species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus nutrition on growth, development and mineral nutrition of potato (*Solanum tuberosum*¹). *Plant Physiology* **101**: 771–782.

McArthur DAJ, Knowles NR. 1993b. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the response of potato to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* **101**: 147–160.

Meloun M, Militký J. 2006. Kompendium statistického zpracování dat: Metody a řešené úlohy, 2. vydání. *Academia*, Praha.

Moora M, Öpik M, Sen R, Zobel M. 2004. Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology* **19**: 554–562.

Mummey DL, Rillig MC. 2006. The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil* **288**: 81–90.

Mummey DL, Rillig MC, Holben WE. 2005. Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant and Soil* **271**: 83–90.

Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **164**: 357–364.

Münzbergová Z, Chýlová T. 2008. Past land use co-determines the present distribution of dry grassland plant species. *Preslia* **80**: 183–198.

Muyzer G, de Wall EC, Uitterlinder AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695–700.

Nadian H, Smith SE, Alston AM, Murray TR. 1997. Effects of soil compaction on plant growth, phosphorus uptake and morphological characteristics of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist* **135**: 303–311.

Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bösch R, van der Heijden M, Sieverding E. 2010. Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 724–738.

Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A, Ma P. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2816–2824.

Olsen SR, Sommers LE. 1982. Phosphorus. V: Page *et al.* (eds.). Methods of soil analysis. Part 2 - Chemical and microbiological properties, 2. vydání. *American Society of Agronomy, Agronomy Monograph* **9**, Madison.

Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, 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**: 424–37.

Öpik M, Moora M, Liira J, Kõljalg U, Zobel M, Sen R. 2003. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist* **160**: 581–593.

Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U, Zobel M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* **188**: 223–41.

Öster M, Ask K, Römermann C, Tackenberg O, Eriksson O. 2009. Plant colonization of ex-arable fields from adjacent species-rich grasslands: The importance of dispersal vs. recruitment ability. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **130**: 93–99.

Pánková H, Münzbergová Z, Rydlová J, Vosátka M. 2008. Differences in AM fungal root colonization between populations of perennial Aster species have genetic reasons. *Oecologia* **157**: 211–20.

Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 763–775.

Pasqualini D, Uhlmann A, Stürmer SL. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species

from the Atlantic rain forest in South Brazil. *Forest Ecology and Management* **245**: 148–155.

Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158–IN18.

Piotrowski JS, Rillig MC. 2008. Succession of arbuscular mycorrhizal fungi : patterns, causes, and considerations for organic agriculture. V: Sparks DL (ed.): *Advances in Agronomy* **97**, Elsevier, New York: 111–130.

Püschel D, Rydlová J, Vosátka M. 2007a. The development of arbuscular mycorrhiza in two simulated stages of spoil-bank succession. *Applied Soil Ecology* **35**: 363–369.

Püschel D, Rydlová J, Vosátka M. 2007b. Does the sequence of plant dominants affect mycorrhiza development in simulated succession on spoil banks? *Plant and Soil* **302**: 273–282.

Redecker D, Hijri I, Wiemken A. 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobotanica* **38**: 113–124.

Regvar M, Vogel K, Irgel N, Wraber T, Hildebrandt U, Wilde P, Bothe H. 2003. Colonization of pennycresses (*Thlaspi* spp.) of the Brassicaceae by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology* **160**: 615–26.

Reich PB, Oleksyn J, Tilman GD, Oeksyn J. 2004. Global patterns to temperature of and leaf latitude in relation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11001–11006.

Reinhart KO, Wilson GWT, Rinella MJ. 2012. Predicting plant responses to mycorrhizae: integrating evolutionary history and plant traits. *Ecology Letters* **15**: 689–695.

Richter BS, Tiller RL, Stutz JC. 2002. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal propagules and colonization from abandoned agricultural fields and semi-arid grasslands in riparian floodplains. *Applied Soil Ecology* **20**: 227–238.

Rodríguez-Echeverría S, de la Peña E, Moens M, Freitas H, van der Putten WH. 2009. Can root-feeders alter the composition of AMF communities? Experimental evidence from the dune grass *Ammophila arenaria*. *Basic and Applied Ecology* **10**: 131–140.

Rosendahl S, Taylor JW. 1997. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLPTM. *Molecular Ecology* **6**: 821–829.

Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsson K-H, Kuyper TW, Taylor AFS, Finlay RD. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* **159**: 775–783.

Ruprecht E. 2006. Successfully recovered grassland: a promising example from romanian old-fields. *Restoration Ecology* **14**: 473–480.

Rydlová J, Vosátka M. 2001. Associations of dominant plant species with arbuscular mycorrhizal fungi during vegetation development on coal mine spoil banks. *Folia Geobotanica* **36**: 85–97.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.*

Sanders IR, Clapp JP, Wiemken A. 1996. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **133**: 123–134.

Sanger JC, Finlay RD, Tehler A. 2006. DNA sequencing with chain-terminating. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **74**: 5463-5467.

Santos JC, Finlay RD, Tehler A. 2006. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* **172**: 159–168.

Selosse MA, Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 15–20.

Shapiro ASS, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality (Complete Samples). *Biometrika* **52**: 591–611.

Sharma D, Kapoor R, Bhatnagar AK. 2009. Differential growth response of *Curculigo orchioides* to native arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities varying in number and fungal components. *European Journal of Soil Biology* **45**: 328–333.

Schüssler A, Gehrigh H, Schwarzott D, Walker C. 2001. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* **105**: 5–15.

Schwartz MW, Hoeksema JD, Gehring CA, Johnson NC, Klironomos JN, Abbott LK, Pringle A. 2006. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology letters* **9**: 501–515.

Smith FA, Jasobsen I, Smith SE. 2000. Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **147**: 357–366.

Smith SE, Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. *Academic press*, London.

Stockinger H, Krüger M, Schüssler A. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **187**: 461–74.

Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1997. Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from a calcareous grassland. *Journal of Ecology* **85**: 181–191.

Studnička M. 1972. Dry grasslands in České Středohoří: A study of ecology and phytocenology. Diplomová práce. *Karlova Univerzita, Praha*.

Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae* **107**: 245–253.

Sýkorová Z, Börstler B, Zvolenská S, Fehrer J, Gryndler M, Vosátka M, Redecker D. 2012. Long-term tracing of *Rhizophagus irregularis* isolate BEG140 inoculated on *Phalaris arundinacea* in a coal mine spoil bank, using mitochondrial large subunit rDNA markers. *Mycorrhiza* **22**: 69–80.

Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D. 2007. Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5426–5434.

Székely AJ, Sipos R, Berta B, Vajna B, Hajdú C, Márialigeti K. 2009. DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. *Microbial Ecology* **57**: 522–33.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.

Tester M, Smith SE, Smith FA. 1987. The phenomenon of “ nonmycorrhizal ” plants. *Canadian Journal of Botany* **65**: 419–431.

Thonar C, Frossard E, Smilauer P, Jansa J. 2014. Competition and facilitation in synthetic communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* **23**: 733–746.

Thonar C, Schnepf A, Frossard E, Roose T, Jansa J. 2011. Traits related to differences in function among three arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **339**: 231–245.

Toljander JF, Santos-González JC, Tehler A, Finlay RD. 2008. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 323–38.

Treseder KK. 2013. The extent of mycorrhizal colonization of roots and its influence on plant growth and phosphorus content. *Plant and Soil* **371**: 1–13.

Trouvelot A. 1986. Citováno podle: Gryndler M, Baláž M, Hršelová H, Jansa J, Vosátka M. 2004. Mykorhizní symbióza. *Akademia, Praha*.

Vandenkoornhuysen P, Husband R, Daniell TJ, Watson IJ, Duck JM, Fitter AH, Young JPW. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* **11**: 1555–1564.

Vandenkoornhuysen P, Leyval C, Bonnin I. 2001. High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* **87**: 243–253.

van der Heijden MGA. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity: in search of underlying mechanisms and general principles. V: van der Heijden MGA & Sanders IR (eds.): *Mycorrhizal Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin: 243–265.

van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69–72.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BPPA, Horz HP. 2009. T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel *Methanobrevibacter* phylotype. *Oral Microbiology and Immunology* **24**: 417–422.

Viera A, Glenn MG. 1990. DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* **82**: 263–267.

Vivas A, Biró B, Ruíz-Lozano JM, Barea JM, Azcón R. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* **62**: 1523–1533.

Vogelsang KM, Reynolds HL, Bever JD. 2006. Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist* **172**: 554–562.

Wilson GWT, Hartnett DC. 1998. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany* **85**: 1732–1738.

Wubet T, Weiß M, Kottke I, Oberwinkler F. 2006a. Two threatened coexisting indigenous conifer species in the dry Afromontane forests of Ethiopia are associated with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany* **84**: 1617–1627.

Wubet T, Weiss M, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F. 2006b. Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of Glomeraceae. *Mycological Research* **110**: 1059–1069.

Zangaro W, Nishidate FR, Vandresen J, Andrade G, Nogueira MA. 2007. Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* **23**: 53–62.

Zarei M, Hempel S, Wubet T, Schäfer T, Savaghebi G, Jouzani GS, Nekouei MK, Buscot F. 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution* **158**: 2757–2765.

Zhu Y, Smith SE, Barritt AR, Smith FA. 2001. Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant and Soil* **237**: 249–255.

Webové zdroje:

<http://cran.r-project.org/web/packages/TRAMPR/index.html> (2013)

http://www.chmi.cz/portal/dt?portal_lang=cs&menu=JSPTabContainer/P4_Historicka_data/ (2014)

<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html> (2012)

<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (2013)

<http://www.R-project.org> (2013)

<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/> (2013)

8. PŘÍLOHY

Druh:	Počet zanalyzovaných vzorků z biotopu:	
	Suchý trávník	Opuštěné pole
<i>Brachypodium pinnatum</i> (L.) P. Beauv. válečka prapořitá	5	5
<i>Briza media</i> L. třeslice prostřední	5	-
<i>Inula salicina</i> L. oman vrbolistý	3	2
<i>Aster amellus</i> L. hvězdnice chlumní	2	-
<i>Stachys recta</i> L. čistec přímý	5	4
<i>Prunella grandiflora</i> (L.) Scholler	4	-
<i>Galium verum</i> L. svízel syřišťový	5	4
<i>Asperula cynanchica</i> L. mařinka psí	4	-
<i>Linum catharticum</i> L. len počistivý	5	5
<i>Linum tenuifolium</i> L. len tenkolistý	5	-
<i>Securigera varia</i> L. čičorka pestrá	5	5
<i>Anthyllis vulneraria</i> L. úročník bolhoj	4	-
Celkem:	52	25

Příloha 1: Tabulka s druhy rostlin a s počty vzorků, ze kterých byly udělána analýza T-RFLP společenstva AM hub na lokalitě.

Mbol + přední TRF		Mbol + zadní TRF	
Výskyt pozorovaných délek TRF	Rozpětí faktických délek TRF	Výskyt pozorovaných délek TRF	Rozpětí faktických délek TRF
173,62 - 175,64	179	77,38 - 79,33	83
191,90 - 195,96	197 - 199	81,38 - 83,33	87
234,56 - 236,58	239	97,38 - 99,33	103
242,69 - 244,71	247	102,38 - 108,33	108 - 112
281,28 - 292,45	285 - 294	113,38 - 116,33	119 - 120
294,49 - 297,53	298 - 299	131,38 - 133,33	137
303,63 - 308,70	307 - 310	142,38 - 147,33	148 - 151
318,86 - 330,03	322 - 331	150,38 - 156,33	156 - 160
356,44 - 358,47	359	192,38 - 196,33	198 - 200
360,51 - 369,64	363 - 370	198,38 - 201,33	204 - 205
471,22 - 473,24	472	239,38 - 241,33	245
519,97 - 522,00	520	254,38 - 256,33	260
554,55 - 572,39	564 - 576	258,38 - 261,33	264 - 265
		268,38 - 270,33	274
		320,38 - 322,33	326
		360,38 - 362,33	366
		514,38 - 516,33	520
		554,55 - 572,39	564 - 576

Příloha 2: V tabulce jsou shrnuta rozpětí délek TRF, ve kterých se vyskytují pozorované délky TRF a rozpětí faktických délek pro každou kombinaci enzymu Mbol a předního / zadního TRF. Z rozpětí délek TRF, ve kterých se vyskytují pozorované délky TRF byl vytvořen soubor „binů“ pro enzym Mbol a přední / zadní TRF.

TaqI + přední TRF		TaqI + zadní TRF	
Výskyt pozorovaných délek TRF	Rozpětí faktických délek TRF	Výskyt pozorovaných délek TRF	Rozpětí faktických délek TRF
102,58 - 105,62	109 - 110	53,63 - 55,20	59
176,73 - 178,75	182	60,63 - 62,20	66
180,79 - 183,83	186 - 187	95,63 - 105,20	101 - 109
184,85 - 187,89	190 - 191	108,63 - 116,20	114 - 120
188,92 - 190,94	194	129,63 - 133,20	135 - 137
206,18 - 208,20	211	144,63 - 146,20	150
215,32 - 218,36	220	190,63 - 195,20	196 - 199
246,81 - 248,83	251	197,63 - 200,20	203 - 204
251,89 - 253,91	256	230,63 - 237,20	236 - 241
267,12 - 269,15	271	240,63 - 245,20	246 - 249
279,31 - 296,57	283 - 298	271,63 - 277,20	277 - 281
315,88 - 329,07	319 - 330	350,63 - 353,20	356 - 357
333,14 - 335,17	336	373,63 - 377,20	379 - 381
355,49 - 357,51	358	384,63 - 386,20	390
367,68 - 372,75	370	570,03 - 577,75	576
378,85 - 380,87	381		
461,12 - 463,15	462		
550,03 - 556,75	555		
570,03 - 577,75	575 - 576		

Příloha 3: V tabulce jsou shrnuta rozpětí délek TRF, ve kterých se vyskytují pozorované délky TRF a rozpětí faktických délek pro každou kombinaci enzymu TaqI a předního / zadního TRF. Z rozpětí délek TRF, ve kterých se vyskytují pozorované délky TRF byl vytvořen soubor „binů“ pro enzym TaqI a přední / zadní TRF.