

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Natálie Bernardová**

*Struktura, vývoj a funkce mikrobiálních společenstev v odumřelém dřevě*  
*Assembly, successional development and functioning of microbial communities in*  
*deadwood*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Vendula Brabcová, Ph.D.

Praha, 2020

### 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, 8.6.2020

Podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce RNDr. Vendule Brabcové, Ph.D. za možnost vypracovat tuto diplomovou práci pod jejím vedením, za trpělivost, podporu a odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Laboratoře environmentální mikrobiologie, jmenovitě především Mgr. Vojtěchovi Tláskalovi za pomoc při statistickém vyhodnocování výsledků a vedoucímu laboratoře Doc. RNDr. Petru Baldrianovi, Ph.D. Projekty byly financovány z projektu Grantové agentury České Republiky č. 17 – 20110.

## Abstrakt

Mrtvé dřevo představuje jeden z nejvýznamnějších rezervoárů uhlíku v lesních ekosystémech. V přirozených lesích je jeho objem vyšší, počítaný na řádově stovky  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ , zatímco v hospodářských lesích je jeho objem stanovován pouze v desítkách  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ . Na rozdíl od rostlinného opadu nebo půdy, je mrtvé dřevo v prostoru nerovnoměrně rozloženo a má specifické fyzikálně-chemické vlastnosti: vysoký obsah těžce rozložitelných polymerů, nízké množství dusíku a je nepropustné. Tyto vlastnosti negativně ovlivňují rychlost rozkladu, zvláště v jeho počátečních fázích. Díky těmto vlastnostem dochází k jeho velmi pomalému rozkladu mikroorganismy, kumuluje se, a proto představuje hlavní rezervoár živin.

Tato diplomová práce je zaměřena na popis struktury, vývoje a funkce houbového společenstva v mrtvém dřevě rozkládajícího se v přirozeném bezzásahovém lese a analýzu některých funkčních vlastností hub podílejících se na rozkladu dřeva. Současně byly popsány změny ve fyzikálně-chemických vlastnostech dřeva jako je pH, obsah uhlíku a dusíku v jednotlivých druzích studovaných stromů, ve 4 věkových třídách - stádiích rozkladu. Pro charakterizaci houbového společenstva na základě ITS2 byla použita metoda sekvenace nové generace (NGS) na platformě Illumina MiSeq. Pro analýzu funkčních vlastností byly houby z tlejících kmenů izolovány do čistých kultur. Byly popsány jejich základní fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich degradační schopnosti vůči lignocelulózním substrátům.

Délka rozkladu a druhy stromů byly hlavními proměnnými vysvětlujícími rozdíly ve složení společenstev v čase i u dvou rok odběrů (2013 a 2017). Relativní zastoupení jednotlivých houbových kmenů a řádů pro tyto dva odběry výrazněji nelišilo. K výraznějším změnám docházelo až na úrovni houbových rodů (jak mezi věkovými třídami tak mezi druhy stromů). Se změnou společenstva hub v průběhu rozkladu se měnily i fyzikálně-chemické vlastnosti dřeva a hodnoty enzymových aktivit. Se stoupajícím obsahem dusíku v průběhu rozkladu dřeva, stoupalo i množství houbové biomasy a klesalo pH rozkládajícího se dřeva. Aktivita enzymů potvrdila probíhající rozkladné procesy. Plodnice přítomné na tlejících kmenech mohou částečně odrážet strukturu houbového společenstva uvnitř rozkládaného dřeva. Tyto houby jsou aktivními dekompozitory dřeva.

Klíčová slova: tlející dřevo, dekompozice, mikrobiální společenstva, dřevokazné houby, ITS, Illumina MiSeq sekvenování, rozklad organické hmoty, lesní ekosystém

## **Abstract**

Dead wood is one of the most important reservoirs associated with forest ecosystems. In natural forests, its volume is counted in hundreds of m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>, whereas it reaches only tens of m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> in productive commercial forests. In contrast to soil and plant litter, deadwood is unevenly distributed on the forest floor. The specific physicochemical properties such as high content of recalcitrant polymers, low nitrogen level and impermeability negatively affect the rate of decomposition especially in the initial stages of wood deconstruction. The deadwood decomposition is very slow in comparisons with other substrates, it accumulates and thus it represents the important reservoir of nutrients.

This thesis is focused on the structure, development and function of microbial (fungal) community in decomposing deadwood in unmanaged forest. Functional screening of fungi isolated from fruit bodies collected from coarse deadwood was set aside. Physico-chemical properties of deadwood including pH, carbon and nitrogen content and microbial biomass were estimated for four wood decomposition stages and three different tree species. New generation sequencing (Illumina MiSeq platform) was applied for fungal community structure analysis based on ITS2 fragment. Fungal functional screening was based on physico-chemical properties of collected fruitbodies and their enzymatic activities towards lignocellulose substrates.

The length of decomposition and tree species were the main the variables explaining the differences in the composition of communities in deadwood in time and for samples from year 2013 and 2017. Relative abundance of fungal phyla and orders was rather similar, however, changes in fungal community composition was detectable in relative abundance of fungal genera. Changes in detected in physico-chemical composition of deadwood and extracellular enzyme activities. The nitrogen level and fungal biomass increased along the decomposition process, pH of decomposed deadwood decreased. Extracellular enzyme activity proved the running fungal driven decomposition. Fungal fruitbodies present on coarse deadwood can partially reflect the fungal community decomposition inside the deadwood. These fungi are active wood decompositors.

Key words: deadwood, decomposition, microbial communities, wood decomposing fungi, ITS, next-generation-sequencing, soil organic matter, forest ecosystem

# Obsah

Seznam zkratk	10
1 Úvod	11
2 Literární přehled	13
2.1 Model přirozeného lesního ekosystému Žofinský prales	13
2.2 Význam tlejícího dřeva	14
2.3 Struktura a chemické složení dřeva	15
2.4 Rozklad celulózy, hemicelulózy a pektinu	18
2.5 Faktory ovlivňující dekompozici dřeva v lesním ekosystému	24
2.6 Mikrobiální společenstva	25
2.6.1 Houby rozkládající dřevní hmotu	26
2.6.2 Bakterie podílející se na rozkladu dřeva	28
2.6.3 Houbové a bakteriální interakce	30
3 Cíle práce	32
4 Materiál a metody	33
4.1 Lokalita a vzorkování	34
4.1.1 Sběr plodnic hub	35
4.1.2 Odběr tlejícího dřeva	35
4.2 Izolace a kultivace hub	36
4.3 Biochemické metody	37
4.3.1 Stanovení enzymatické aktivity plodnic hub	37
4.3.2 Enzymové aktivity v tlejícím dřevě	41
4.3.3 Stanovení fyzikálně-chemických vlastností tlejícího dřeva a plodnic	41
4.4 Molekulárně-genetické metody	43
4.4.1 Izolace DNA u izolátů hub a dřeva	43
4.4.2 Ověření identity plodnic hub a hub ze vzorků dřeva	44
4.4.3 Illumina Mi-Seq sekvenování	46
4.5 Vyhodnocení sekvenačních dat z Mi-Seq analýzy	48
4.6 Vyhodnocení funkční struktury houbového společenstva	48
4.7 Statistické zhodnocení výsledků	49
5 Výsledky	50
5.1 Plodnice hub	50
5.1.1 Identifikace plodnic hub izolovaných z tlejících kmenů	50
5.1.2 Analýza prvkového složení	53
5.1.3 Enzymová aktivita	55
5.2 Tlející dřevo	62



5.2.1	Analýza prvkového složení.....	62
5.2.2	Enzymová aktivita .....	67
5.2.3	Identifikace hub v tlejícím dřevě.....	75
6	Diskuze.....	96
6.1	Struktura mikrobiálního společenstva na vybraných kmenech v oblasti Národní přírodní rezervace Žofínský prales.....	96
6.2	Fyzikálně chemické vlastnosti rozkládaného dřeva.....	99
6.3	Vývoj mikrobiálního společenstva v čase (2013-2017).....	102
6.4	Analýza funkčních vlastností hub podílejících se na rozkladu .....	105
7	Souhrn.....	107
8	Seznam použité literatury .....	109

## Seznam zkratek

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ITS	internal transcribed spacer (vnitřní přepisovaný mezerník)
kDa	kilodalton
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone hydrochloride
MnP	manganová peroxidáza
MnSO <sub>4</sub>	síran manganatý
MUF	methylumbellyferol
MUFaG	4-methylumbellyferyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid
MUFC	4-methylumbellyferyl-N-celobiosid
MUFG	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid
MUFL	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
MUFM	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-manopyranosid
MUFN	4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid
MUFP	4-methylumbellyferyl-fosfát
MUFX	4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-xylopyranosid
NGS	next-generation Sequencing (sekvenování nové generace)
PCR	polymerázová řetězová reakce
TAE	tris-acetát-EDTA

# 1 Úvod

Postupný rozklad mrtvého dřeva v lesních ekosystémech představuje důležitou součást biogeochemických cyklů uhlíku, dusíku a fosforu. V přirozených lesích je jeho objem velmi vysoký a může dosáhnout tisícinásobku objemu odumřelého dřeva v hospodářském lese (Stokland et al., 2012). Na rozdíl od ostatních habitatů (rostlinný opad, půda, a další) je mrtvé dřevo v lesním porostu nerovnoměrně rozloženo. Jeho rozklad je však podobně jako u jiných rostlinných materiálů ovlivněn jeho fyzikálně-chemickými vlastnosti, lokalizací a podmínkami stanoviště (Seibold et al., 2015). Na jeho rozkladu se aktivně podílí houby i bakterie. Díky přítomnosti těžce rozložitelných polymerů, nízkého obsahu dusíku v počátečních rozkladu, a nepropustnosti jsou však jeho hlavními dekompozitory saprotrofní houby. Saprotrofní dřevokazné houby jsou díky hyfálnímu růstu, schopnosti translokovat prvky na vzdálenější místa v substrátu a vysoké produkci lignocelulolytických extracelulárních enzymů nejlépe fyziologicky vybaveny pro jeho rozklad. Jak bylo zmíněno, způsob a rychlost rozkladu dřeva je také ovlivněna řadou dalších faktorů př. klimatickými podmínkami, stářím a typem dřeviny (Baldrian 2017). V průběhu rozkladu dřeva dochází ke změnám v poměru uhlíku a dusíku (v průběhu rozkladu se snižuje), obsahu fosforu a pH a ke změnám ve struktuře mikrobiálního společenstva (Rinne et al., 2017).

Rozvoj molekulárně-biologických metod v posledních dvou desetiletích výrazně ovlivnil pohled na významné ekologické procesy, koloběh uhlíku, dusíku a dalších důležitých prvků nejen v lesních a půdních ekosystémech. Zatímco dříve bylo studium omezeno na pozorování plodnic dřevokazných hub, jejich izolaci a charakterizaci a na studium morfologie rozkládaného dřeva, dnešní moderní metody, zvláště pak metody NGS (sekvenování nové generace) umožňují o několik řádů detailnější pohled do vzrušujícího prostředí lesních a půdních ekosystémů. Tyto studie odhalily, že v tlejícím dřevě se vyskytují stovky a tisíce druhů hub a bakteriálních kmenů (Tláskal et al., 2017; Žifčáková et al., 2016). Z detailních analýz lze i poukazovat na jejich možné fyziologické funkce. Návratem k izolaci mikroorganismů lze však získat cenná data k dalšímu studiu. Znalosti růstových a fyziologických charakteristik, metabolických možností, extracelulárních enzymových aktivit, kompletní sekvence genomu, transkriptomu a proteomu umožní posoudit funkční

potenciál mikroorganismů v ekosystému například (Starke et al., 2016). Společenstva v rozkládajícím se dřevě jsou velmi komplexní, dochází v nich k výrazným interakcím a podléhají dynamickému vývoji (Boddy 2001; Voriskova a Baldrian 2013). Jejich funkce výrazně ovlivňuje důležité ekologické a biochemické procesy a jejich poznání je klíčové při poznávání ekologických vztahů v lesních ekosystémech.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Model přirozeného lesního ekosystému Žofínský prales

Národní přírodní rezervace Žofínský prales leží v 735–830 m n. m. (průměr ročních srážek: 866 mm, průměrná roční teplota: 6,2 ° C). Nachází se v Novohradských horách v České republice (48.6652942N, 14.7065467E). Jedná se o přirozený lesní ekosystém, který je od roku 1838 bez zásahu člověka. Celková rozloha rezervace činí 102,71 ha. Od roku 2012 je jádrová část Žofínského pralesa (cca 25 ha) součástí světové výzkumné sítě ForestGEO založené v roce 1980. Předmětem výzkumu ForestGEO jsou lesy tropického pásma a subtropického pásma a další biomy (Janík et al., 2016).

V Žofínském pralesu převažuje výskyt buku lesního (*Fagus sylvatica*, 62% objemu živých stromů) a smrku ztepilého (*Picea abies*, 34%), další dřeviny jako např. jedle (*Abies alba*) tvoří 4% (Šamonil et al., 2016). Patří do ekosystému lesů mírného pásma (lesy smíšené), které představují celosvětově důležitý zdroj uhlíku (Baldrian 2017).

Jádrová část Žofínského pralesa (786 m.n.m.), jako model přirozeného lesního ekosystému v mírném podnebném pásmu, je předmětem výzkumu například z hlediska rozkladu dřevní hmoty (rostlinných polymerů) vybraných kmenů pomocí enzymatických komplexů nacházejících se u dřevokazných hub nebo bakterií (Baldrian et al., 2016). Kromě mrtvého dřeva a jeho mikrobiálních společenstev, jsou předmětem výzkumu v lesních ekosystémech i ostatní habitaty: půda, opad, kořeny a rhizosféry, půdní vegetace a další (Šamonil et al., 2013). Jako přirozený lesní ekosystém je také důležitý z hlediska potenciálního snižování CO<sub>2</sub> v atmosféře (Naudts et al., 2016). V lesích také dochází k různým disturbancím (př. požáry, větrné polomy), které spolu antropogenními faktory a klimatickými změnami, snadno ovlivní biogeochemický koloběh uhlíku. Pro efektivní udržení lesních ekosystémů je nezbytné tyto mikrobiální procesy pochopit a výsledky výzkumů zohlednit při výběru vhodného způsobu správy a využití lesa (Gauthier et al., 2015).

## 2.2 Význam tlejícího dřeva

Tlející dřevo představuje jeden z nejvýznamnějších rezervoárů uhlíku v lesních ekosystémech. Protože je rozklad dřeva velmi pomalý, dochází v lesních ekosystémech k jeho kumulaci. Množství uhlíku kumulovaného v odumřelém dřevě může dosáhnout až množství obsaženého ve stojících živých stromech (Král et al., 2010; Stokland, et al., 2012). Objem tlejícího dřeva závisí na typu lesa. V přirozených lesích Evropy může jeho objem dosáhnout až  $1200 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , zatímco v produkčních lesích toto množství klesá na jednotky  $\text{m}^3 \text{ ha}^{-1}$  (Stokland et al., 2012). Objem živých stromů v Žofínském pralese je vypočítán na  $690 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  (Král et al., 2014), zatímco objem mrtvého dřeva (padlé mrtvé stromy a zbytky velkých větví) činí 6–41 % celkového objemu dřeva ( $102\text{-}310 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ ) s průměrným objemem  $208 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$  (Král et al., 2010; Šamonil et al., 2013). Na rozdíl od rostlinného opadu (listí, jehličí a větvičky) je tlející dřevo v prostoru nerovnoměrně rozloženo a má specifické fyzikálně-chemické vlastnosti.

Během rozkladu dřeva dochází k uvolňování uhlíku, který je respirován nebo je ve formě rozpuštěného organického uhlíku (mineralizován). Ten se pak koncentruje v půdě. Rozklad dřeva tedy příznivě zvyšuje množství organické hmoty v půdě, která tak představuje významný zdroj živin pro lesní ekosystémy. Tlející dřevo tak představuje zásobárnu uhlíku, dusíku, fosforu, draslíku, vápníku a hořčíku (Baldrian 2017; Magnússon et al., 2016).

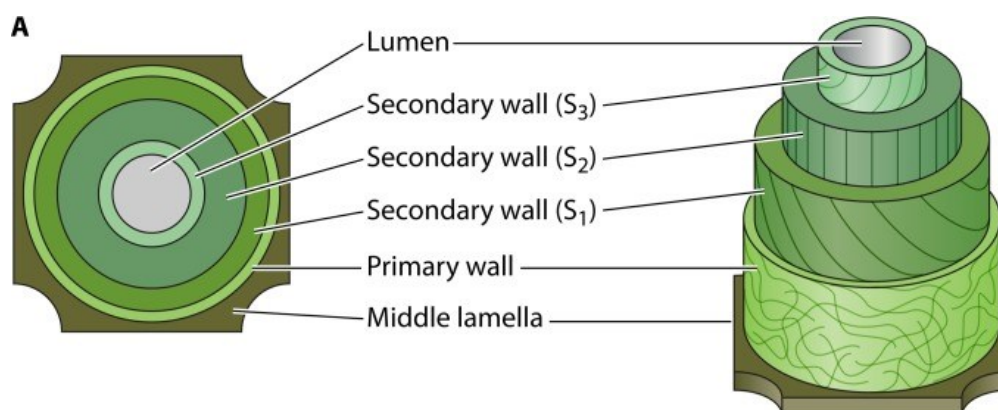
Mrtvé dřevo je asociováno se značným množstvím různých organismů například již zmiňovaných bakterií, hub, ale také rostlin a živočichů. Patří tedy k druhově nejbohatším nikám lesního ekosystému a je vysoce důležité pro zachování biodiverzity (Stokland et al., 2012).

## 2.3 Struktura a chemické složení dřeva

Dřevo je základním stavebním polymerem odumřelých buněčných stěn rostlin. Buněčná stěna odumřelých rostlinných buněk je obvykle tvořena třemi vrstvami (obr. 1):

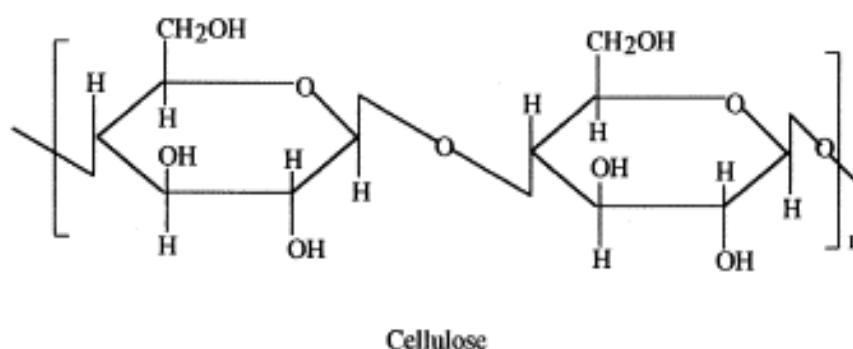
- střední lamelou tvořenou převážně amorfním pektinem, který zajišťuje spojení mezi sousedními buňkami,
- primární buněčnou stěnou tvořenou fibrilami celulózy (30 %), hemicelulózou (25 %), pektinem (35 %) a proteiny (10 %),
- sekundární buněčnou stěnou, kterou lze dále rozdělit na tři vrstvy lišící se tloušťkou, uspořádáním a obsahem celulózových mikrofibril a funkcí (Schwarze et al., 2013). Zatímco střední tlustá vrstva (S2) zajišťuje buňce mechanickou odolnost v podélném směru, tenké vrstvy S1 a S3 zajišťují pevnost dřeva v příčném směru (Dinwoodie, 2000). Celkově sekundární buněčnou stěnu z 35 % tvoří celulóza, z 25% hemicelulóza včetně pektinu a do 35 % lignin v závislosti na rostlinném druhu (Mellerowicz a Sundberg, 2008).

Chemicky je to komplexní substrát skládající se z různých polymerů, z nichž nejvýznamnější jsou celulóza (50 %), hemicelulóza (30 %) a lignin (20 %). Přesné chemické složení je ale opět druhově specifické. Dalšími složkami dřevní hmoty jsou pektiny, pryskyřice a bílkoviny (Rytioja et al., 2014). Vzájemný poměr těchto složek a struktura dřeva ovlivňuje rychlost jeho degradace a zastoupení jednotlivých organismů, které se na rozkladu podílejí (Robinson, 1990).



Obrázek 1 Model struktury buněčné stěny rostlin. Tři vrstvy buněčné stěny: střední lamela (middle lamela) a primární a sekundární stěna (primary, secondary wall, vrstvy lamel S1, S2 a S3) (převzato z Rytioja et al., 2014).

- **Celulóza** je na Zemi nejhojněji se vyskytující polymer, který tvoří hlavní složku buněčné stěny u rostlin. Polymer je složen z D-glukózových zbytků (obr. 2), které jsou spojeny  $\beta$ -1,4-glykozidickými vazbami a vytváří tak lineární polymerní řetězce (Hon, 1994). Lineární polymerní řetězce jsou mezi sebou propojeny intermolekulárními vodíkovými vazbami a vytvářejí mikrofibrily a amorfní oblasti. Poměr struktur se liší, jak mezi jednotlivými rostlinnými druhy, tak i mezi primární a sekundární buněčnou stěnou. Ve vnější vrstvě primární stěny jsou mikrofibrily nepravidelně uspořádány, ve vnitřní vrstvě jsou orientovány kolmo (Sjostrom, 1993).



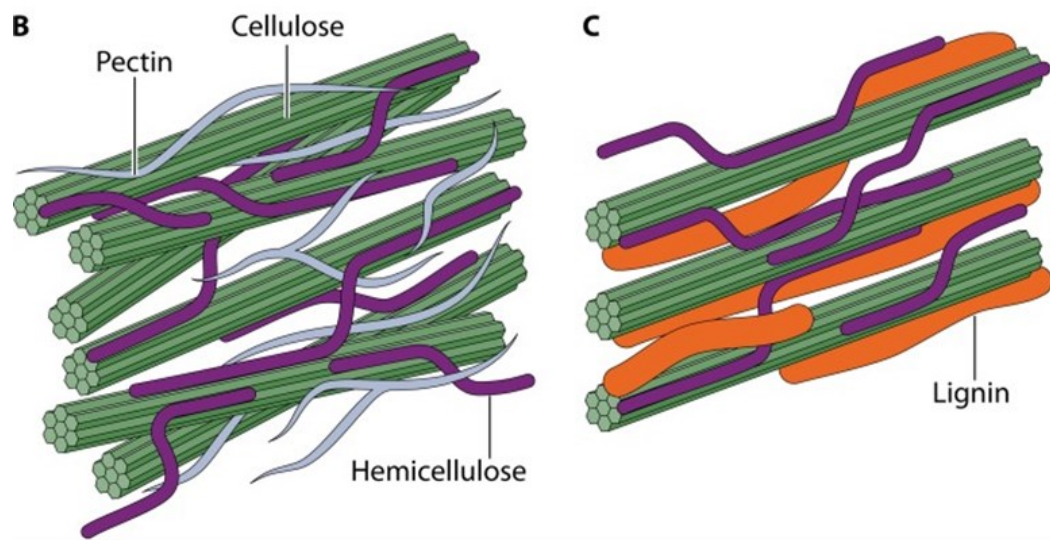
Obrázek 2 Chemický vzorec celulózy (převzato z Kumar, 2000).

- **Hemicelulóza** je polymer tvořený několika různými cukernými jednotkami a substituenty postranních řetězců. Může být lineární nebo větvený a příkladem cukerných jednotek je D-glukóza, D-manóza a D-xylóza (Sjöström, 1993). U jednotlivých druhů stromů se liší zastoupení cukerných jednotek, u „měkkých“ dřevin (př. borovice) jsou typicky, ve vyšší míře, přítomny galaktoglukomanany, naopak u „tvrdých“ dřevin (př. bříza) převažují glukuronoxylany. „Tvrdé“ dřeviny obsahuje více ligninu a méně celulózy než dřeviny „měkké“ (Dekker, 1985). Hemicelulóza je stejně jako celulóza, jednou z hlavních komponent buněčné stěny rostlin. V primární buněčné stěně je vázáná společně s pektinem a v sekundární buněčné stěně s ligninem (Baldrian a Valášková, 2008; Eriksson et al., 1990).
- **Lignin** je větvený aromatický heteropolymer složený ze tří monolignolových monomerů (prekursorů): *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, které mají různý počet methoxylovaných substituentů na aromatickém kruhu a v molekule ligninu jsou zastoupeny v různém poměru (Brunow a Lundquist, 2010; Ralph et al., 2004). Lignin zvyšuje integritu a odolnost rostlinné buňky vůči rostlinným patogenům a jiným predátorům (Várnai et al., 2014). Jehličnaté stromy



mají obvykle vyšší obsah ligninu složeného z guaiacylu s malým podílem *p*-hydroxyphenylu, naopak u listnatých stromů je nižší obsah ligninu tvořený stejným dílem guaiacylu a syringylu (Cornwell et al., 2009).

- **Pektin** je součástí střední lamely a primární buněčné stěny rostlinné buňky (obr. 3), u které zvyšuje ohebnost. Pektin váže na rostlinné buňky molekuly vody (Raven et al., 1999). Jedná se o komplexní hydrofilní polysacharid. Struktura je velmi variabilní, hlavní složkou pektinu je kyselina D-galakturonová, dále jsou zastoupeny manóza, arabinóza, galaktóza nebo fukóza (Jayani et al., 2005; Willats et al., 2006).



Obrázek 3 Polysacharidy a lignin, obklopující plazmatickou membránu, jsou v primární (B) a sekundární stěně (C). (převzato z Rytioja et al., 2014).

## 2.4 Rozklad celulózy, hemicelulózy a pektinu

Ačkoliv je chemické složení celulózy, jako hlavní složky dřeva, jedná se o vázané glukózové jednotky, je její morfologická struktura velmi složitá. Celulózní vlákna jsou vzájemně provázány mezi sebou a váží se na další složky buněčné stěny - hemicelulózy a lignin. K rozkladu dřeva proto obecně dochází extracelulárně produkovanými enzymy, které z polymerů uvolňují kratší oligo a disacharidy. Tyto jsou pak již transportovány do buněk dekompozitorů a dále zpracovány jako zdroj uhlíku a energie (shrnutí například v (Wilson, 2011)). Výsledným produktem štěpení jsou CO<sub>2</sub> a voda v aerobním prostředí, v anaerobním prostředí vzniká navíc metan (Béguin a Aubert, 1994).

Hlavní enzymy rozkladu celulózy a hemicelulózy patří mezi tzv. CAZYmy (Carbohydrate-Active enZymes), tedy enzymy s vazebnými a katalytickými doménami, které štěpí, modifikují nebo vytvářejí glykozidické vazby (<http://www.cazy.org/>). Ty se klasifikují do skupin dle sekvence a struktury proteinu. Hlavními degradačními enzymy jsou obecně glykozylyhydrolázy (GH) napadající hlavní kostru a boční řetězce polymeru. Společně s dalšími CAZYmy: karbohydrát esterázami (CE), polysacharid lyázami (PL) a lytickými polysacharid monooxygenázami (LPMO) zajišťují degradaci celulózy a hemicelulózy v různých ekosystémech (Lombard et al., 2014). Z klasického pohledu jsou celulózy a hemicelulózy děleny dle jejich aktivity vůči polymeru. Endocelulózy, endoxylánázy a endomananázy štěpí vnitřní  $\beta$ -1,4-D vazby v polymeru, exocelulózy či celobiohydrolázy štěpí na redukujícím i neredukujícím konci polymeru a  $\beta$ -glukosidázy,  $\beta$ -manosidázy,  $\beta$ -xylosidázy štěpí disacharidy (Baldrian a Valášková, 2008; Horn et al., 2012).

Celkový rozklad dřeva tedy vyžaduje řadu synergisticky působících enzymů. Většina dekompozitorů produkuje větší hydrolytické enzymy pařící do více GH rodin. Struktura dřeva je navíc velmi komplexní a mnoho GH rodin obsahuje enzymy, které degradují více substrátů najednou (Sukharnikov et al., 2011). Enzymy s celulolytickou aktivitou převážně patří do rodin GH1, GH3, GH5, GH6, GH8, GH9, GH12, GH45, GH48, GH51 and GH74 (Brumm et al., 2018). Přehled funkcí v jednotlivých GH rodinách vztahujících se k dekompozici dřeva je uveden v tabulce 1.

<b>Polymer</b>	<b>Cílová struktura</b>	<b>GH rodiny</b>
Celobióza	Celooligosacharidy	GH1 ( $\beta$ -glukozidáza/ $\beta$ -xylosidáza), GH3 ( $\beta$ -glukozidáza/ $\beta$ -xylosidáza/endoxylanáza), GH116 ( $\beta$ -glukozidáza/ $\beta$ -xylozidáza)
Celulóza	Buňčná stěna rostlin	GH5_1, GH5_2, GH5_4, GH5_5, GH5_25, GH5_26, GH5_38, GH5_39, GH5_46 (endoceuláza), GH6 (exoceuláza/endoceuláza), GH7 (exoceuláza/endoceuláza), GH8 (endoceuláza/endoxylanáza), GH9 (exoceuláza/endoceuláza/endoxylanáza/ $\beta$ -glukozidáza), GH12 (endoceuláza/endoxylanáza), GH44 (endoceuláza/endoxylanáza), GH45 (endoceuláza), GH48 (exoceuláza/endoceuláza/chitináza), GH74 (endoceuláza), AA9 (lytická polysacharidmonooxygenáza)
Lignin	Buňčná stěna rostlin	AA1 (lakáza), AA2 (peroxidáza), AA3 (oxidáza), AA4 (oxidáza), AA5 (oxidáza), AA6 (oxidáza), AA12 (oxidáza)
Pektin	Buňčná stěna rostlin	GH5_7, GH5_8, GH5_10, GH5_17, GH5_19, GH5_36 ( $\beta$ -mananáza/endo- $\beta$ -1,4-mananáza), GH28 (polygalacturonáza/rhamnogalakturonáza), GH62 ( $\alpha$ -L-arabino-furanosidáza), GH78 ( $\alpha$ -L-rhamnosidáza), GH88 ( $\beta$ -glukuronyl hydroláza), GH105 (glukuronyl hydroláza/galakturnyl hydroláza), GH106 ( $\alpha$ -L-rhamnosidáza)
Xylan	Buňčná stěna rostlin	GH5_22 ( $\beta$ -xylozidáza), GH10 (endo-1,4- $\beta$ -xylanáza/endo-1,3- $\beta$ -xylanáza), GH11 (endoxylanáza), GH30 (endoxylanáza/ $\beta$ -xylosidáza), GH67 (xylan $\alpha$ -1,2-glukuronidáza), GH115 (xylan $\alpha$ -1,2-glukuronidáza), GH120 ( $\beta$ -xylozidáza)

Tabulka 1 Přehled řazení enzymů aktivních pro rozkladu lignocelulózy dle databáze CAZY (<http://www.cazy.org/>), převzato a upraveno ze (Zifčáková et al., 2017).

Jak již bylo nastíněno, hemicelulázy jsou podobným způsobem jako celulózy zodpovědné za rozklad hemicelulóz typu xylan, xyloglukan, arabinoxylan a glukoman. Na rozdíl od celulózy je vzhledem k různému chemickému složení potřeba širšího spektra působících enzymů jako endoxylanázy, endomananázy, xylosidázy, glukosidázy, arabinosidázy, galaktosidázy, manosidázy a glukuronidázy. Enzymy s hemicelulolytickými aktivitami patří převážně do skupin GH2, GH10, GH11, GH16, GH26, GH30, GH31, GH39, GH42, GH43 a GH53 (Brumm, P., 2018). Na rozkladu celulózy a hemicelulóz se však může podílet i řada dalších CAZYMů, například xylanesterázy (CE) a lyázy (PL) a lytické polysacharid monooxygenázy (LPMO) (Nguyen et al., 2018; Sharma et al., 2016). Historicky se v přehledu polysacharidových polymerů uvádějí hydrolytické enzymy, avšak v posledních několika letech dochází ke zdůraznění funkce lytických monooxygenáz, které oxidativním způsobem výrazně napomáhají k efektivnímu rozkladu polymeru (Bissaro, 2017; Ezeilo et al., 2017; Meng et al., 2016). Lytické polysacharid monooxygenázy se řadí do rodin AA9 (eukaryota) a AA10 (prokaryota), několik také do AA13 (Koeck et al., 2014).

V řadě ekosystémů se s degradací celulózy, hemicelulózy a xylanu setkáme převážně u hub a bakterií (Berlemont a Martiny, 2015; Lladó et al., 2017; López-Mondéjar et al., 2018; Nguyen et al., 2018; Tláskal et al., 2016). Bakterie jsou však schopny rozkládat celulózu i v anaerobním prostředí. Spektrum produkovaných enzymů je podobné, nachází se však v komplexech – celulosomech na povrchu buněk (Bayer et al., 2004; Doi a Kosugi, 2004). Strategie byla popsána například u rodů *Clostridium*, *Ruminococcus* nebo *Bacteroides* (Schwarz, 2001). Až 65% všech prokaryotických genomů obsahuje geny pro tyto extracelulární enzymy (Berlemont a Martiny, 2015; Žifčáková et al., 2017). V ekosystémech je výrazná funkční redundance mezi dekompozitory, proto se mohou jednotlivá společenstva taxonomicky odlišovat, avšak jejich funkce je totožná (Berlemont a Martiny, 2015). Současná studie Nguyen et al., 2018 identifikovala přibližně ve 218 genomech hub celkem 9 tisíc genů pro enzymy aktivní na celulóze, hemicelulóze a chitinu. Přestože jsou tyto geny tedy u jednotlivých vývojových skupin přítomny ve více kopiích, je jejich distribuce až druhově specifická (Nguyen et al., 2018).

Na degradaci pektinu se podílejí hydrolytické enzymy patřící zejména do rodin GH5, GH28, GH62, GH78, GH88, GH105, GH106 (tabulka 1) (Samanta et al., 2018;

Žifčáková et al., 2017). Hydrolytický mechanismus je podobná jako u celuláz, například enzymy endopolygalakturonázy a exopolygalakturonázy štěpí uvnitř a na konci polymeru  $\alpha$ -1,4-vázané D-galakturonové kyseliny a odštěpují jí ze struktury homogalakturonanu (van den Brink a de Vries, 2011). Dalším enzymem je lytická polysacharidová monooxygenáza, která depolymerizuje pektin a odštěpuje řetězce postranních substituentů (Baldrian, 2007).

## Rozklad Ligninu

Během degradace ligninu dochází k jeho depolymerizaci a štěpení aromatických kruhů v molekule. Na procesu se podílejí extracelulární enzymy oxidativního charakteru (Datta et al., 2017) patřící dle CAZy třídění do rodin AA1, AA2, AA3, AA4, AA5, AA6, a AA12 (tabulka 1). Díky nezbytné přítomnosti kyslíku nebo jeho reaktivních radikálů při enzymatickém štěpení ligninu není možné, aby rozklad ligninu probíhal v anaerobním prostředí (Berg et al., 2014).

Obecně se dají tyto enzymy rozdělit na enzymy modifikující lignin (LME – lignin-modifying enzymes) a doplňkové lignin – degradační enzymy (LDA - lignin-degrading auxiliary enzymes). LDA nejsou schopny lignin degradovat, avšak pro kompletní rozklad ligninu jsou nezbytné. Tradičně patří mezi LME lakáza (fenol oxidáza (Leonowicz et al., 2001) využívají pro degradaci (oxidaci) polymerů molekulární kyslík a peroxidázy: (lignin peroxidáza (Falade et al., 2017), manganová peroxidáza (Chowdhary et al., 2019) a versatilní peroxidáza (Ravichandran and Sridhar, 2017)) vyžadují pro svou aktivitu přítomnost extracelulárního peroxidu (Baldrian a Valášková, 2008). Nedávno objevenou peroxidázou je barvivo dekolozující peroxidáza (Dye-decolorising peroxidase, DyP (Chowdhary et al., 2019)) nalezená u hub bílé hniloby a rovněž u bakterií (Datta et al., 2017.; Janusz et al., n.d.; Zhang et al., 2019). Lakáza i peroxidázy mohou rovněž přispět k depolymerizaci ligninu produkcí nízkomolekulárních volných radikálů jako je OH radikál (revidováno v (Datta et al., 2017). Přehled funkce, kofaktorů a základních údajů o enzimech je uveden v tabulce 2. Doplňkové enzymy (LDA) přispívají k degradaci ligninu zejména produkcí peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ), jedná se zejména o glyoxaloxidázu, arylalkohol oxidázu, pyranóza-2-oxidázu, celobióza dehydrogenázu, a glukózo oxidázu (tabulka 2).

Enzym	Předpokládaná role při degradaci ligninu	kofaktory	citace
Ligninová peroxidáza (LiP) EC 1.11.1.14	degradace nefenolických jednotek	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aryl alkohol	Falade et al., 2017
Manganová peroxidáza (MnP) EC 1.11.1.13	degradace fenolických i nefenolických jednotek	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , lipidy, Mn <sup>2+</sup>	Chowdhary et al., 2019
Versatilní peroxidáza (VP) EC 1.11.1.16	kombinuje funkce LiP a MnP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aryl alkohol	Ravichandran and Sridhar, 2017
Odbarvující peroxidáza (DyP) EC 1.11.1.19	oxidující a hydrolytické aktivity vůči různým organickým látkám		Colpa et al., 2014
Lakáza EC 1.10.3.2	oxidace fenolických a nefenolických jednotek		Leonowicz et al., 2001
Peroxid vodíku generující enzymy Glyoxal oxidáza EC 1.2.3.5 Arylalkohol oxidáza EC 1.1.3.7 pyranóza-2-oxidáza EC 1.1.3.10	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Janusz et al., 2017

Tabulka 2 Přehled funkcí, kofaktorů a důležitých literárních zdrojů enzymů podílejících se na degradaci ligninu. Převzato a doplněno z (Hatakka a Hammel, 2011).

Historicky byl ligninolytický systém nejvíce prozkoumán u dřevokazných *Basidiomycetes*, zvláště pak hub bílé hniloby. Ty jsou zatím jedinými známými organismy se schopností kompletního štěpení ligninu. Efektivita rozkladu může být velmi vysoká, jak bylo potvrzeno u typického zástupce hub bílé hniloby *Phanerochaete chrysosporium*. Během 15 dní zde došlo k rozkladu cca 53% hmotnosti ligninu (Su et al., 2016). Produkují všechny typy ligninolytických enzymů (Datta et al., 2017). Druhou skupinou dřevokazných hub jsou houby hnědé hniloby. Pro degradaci ligninu těmito houbami jsou typické neenzymatické oxidativní reakce produkující hydroxylové radikály tzv. Fentonovskou reakcí (Kerem et al., 1999). Hydroxylové radikály napadají metoxylové skupiny ligninu a produkují metanol. Takto modifikovaný lignin je pak méně stabilní (Hatakka a Hammel, 2010). Ligninolytické schopnosti byly specificky detekovány zejména u hub z čeledí *Mycenaceae* a *Marasmiaceae* (*Basidiomycota*) a *Rhytismataceae* a *Xylariaceae* (*Ascomycota*) (Osono, 2020).

Bakteriální degradaci ligninu bylo věnováno mnohem méně pozornosti, přestože řada půdních bakterií, zvláště pak *Aktinomycetes* je schopna lignin rozvolnit a mineralizovat, stejně tak od ligninu odvozené látky (Zimmermann, 1990). Současné studie detailněji popsaly způsob bakteriální degradace ligninu. Dvěma hlavními třídami lignin modifikujících enzymů bakterií jsou „odbarvující“ peroxidázy (DyP) a lakázy, které byly nalezeny u řady skupin (Gonzalo et al., 2016). Aktivita bakteriální lakázy se však spíše zaměřuje na degradaci vedlejších produktů degradace ligninu, jako jsou mono- a oligofenoly nebo polychlorované bifenyly, které vznikají v důsledku degradace ligninu například dřevokaznými houbami (Ahmad et al., 2010). DyP degradují široké spektrum substrátů typu veratryl alkohol a barviva. Jsou schopné oxidace  $\beta$ -1-4 glykosidické vazby a  $Mn^{2+}$  (Colpa et al., 2013). V současnosti se ukazuje, že superoxid bismutáza, kataláza-peroxidáza a bakteriální dioxygenáza mohou být dalšími enzymy důležitými pro bakteriální rozklad ligninu (Gonzalo et al., 2016) stejně tak fenol monooxygenáza či vanilinové dehydrogenázy rodu *Pseudomonas* (Zhang et al., 2019).

## 2.5 Faktory ovlivňující dekompozici dřeva v lesním ekosystému

Rychlost rozkladu mrtvého dřeva je velmi nízká. Zatímco až 50 % hmoty stromového opadu je rozloženo během 6 měsíců v závislosti na jeho typu a vnějších podmínkách (Takeda et al., 2005), kompletní rozklad dřevní hmoty může trvat několik desítek let (Brabcová et al., 2016). Rychlost dekompozice dřeva závisí na mnoha faktorech. Důležitou roli hraje druh stromu, stavba a složení dřeva, zvláště zastoupení jednotlivých polymerů, z nichž nejvýznamnější je obsah ligninu (Zell et al., 2009).

Dekompozice odumřelého dřeva je rovněž výrazně ovlivněna klimatem, půdními podmínkami, sluneční expozicí a variabilitou lokálních podmínek (Seibold et al., 2015). Vysoký obsah těžce rozložitelných látek (lignocelulóza), nízké množství dusíku a nepropustnost dále negativně ovlivňuje rychlost jeho rozkladu převážně v jeho počátečních fázích (Baldrian, 2017).

Důležitým faktorem v rozkladu dřeva je poměr C/N, který je v čerstvém dřevě velmi vysoký a typicky se pohybuje v rozmezí stovek jednotek (Rayner and Boddy, 1988). Chemismus rozkládaného dřeva se v průběhu tlení mění. Počáteční vysoký poměr uhlíku a dusíku se v postupně snižuje (Brabcová et al., 2016; Hoppe et al., 2015; Rajala et al., 2011; Stringer et al., 1999). Pokles je zapříčiněn zejména zvýšením relativního obsahu dusíku jako následek mineralizace a respirací uhlíku, translokací dusíku z půdy houbami, ale také aktivitou bakterií, fixujících atmosférický N<sub>2</sub> (Rinne et al., 2017). Během dekompozice dřeva dochází k akumulaci houbové biomasy (Brabcová et al., 2016). Díky vysokému obsahu houbové biomasy v pozdějších stádiích rozkladu s vysokým obsahem chitinu a tedy nízkým C/N poměrem (4-30) (Brabcová et al., 2018, 2016), ovlivňuje přítomnost samotných dekompozitorů chemismus rozkládaného dřeva. Houbová biomasa pak reprezentuje sekundární zdroj živin v těžce kolonizovaném tlejícím dřevě (Colpaert et al., 1996). Aktivitou hub v rozkládajícím se dřevě rovněž dochází k poklesu pH a zvýšení obsahu fosforu jeho translokací hyfami. Zvýšení obsahu fosforu může, stejně jako snížení C/N ovlivnit strukturu společenstva dekompozitorů (Rudnick et al., 2015).



## 2.6 Mikrobiální společenstva

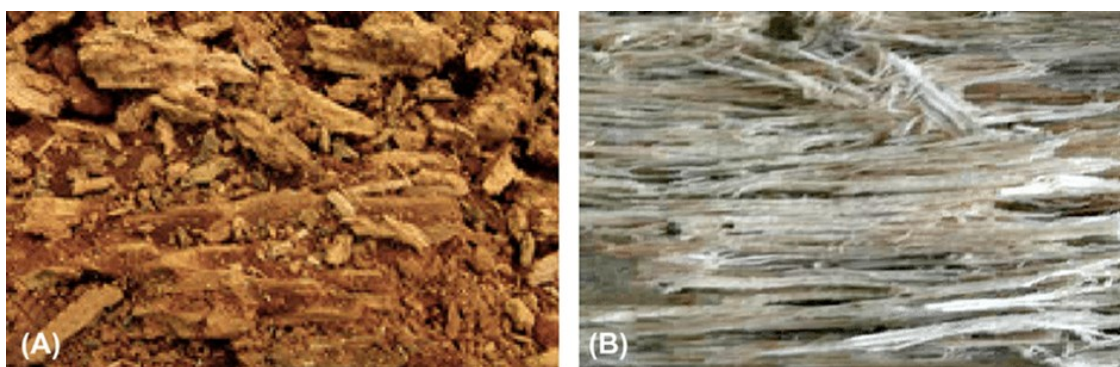
Studie mikrobiálních společenstev v lignocelulózových substrátech odhalilo velké množství mikroorganismů přítomných v tomto unikátním habitatu (Voříšková a Baldrian, 2013). Na rozkladu dřevní hmoty se podílejí dřevokazné houby a bakterie. Dříve se předpokládalo, že v prvotních fázích rozkladu dřevní hmoty, mají vysokou abundanci pouze dřevokazné houby, díky jejich schopnosti rozkládat nepropustné polymery a vláknitému růstu, kterým efektivně kolonizují dřevo (Rajala et al., 2011; Van Der Wal et al., 2007). Relativně brzy se díky pokročilým sekvenačním metodám (NGS), zjistila přítomnost některých bakteriálních kmenů (Johnston et al., 2016). Díky schopnosti mnoha bakteriálních skupin využívat řadu substrátů přítomných v lesní půdě (Starke et al., 2016) lze předpokládat, že podobně vhodné podmínky budou přítomny i během degradace odumřelého dřeva. Bylo potvrzeno, že mnoho půdních bakterií vlastní celou řadu genů pro degradaci celulózy a hemicelulózy (Lladó et al., 2018; López-Mondéjar et al., 2018). Geny pro peroxidázy ze skupiny AA2 byly detekovány například u kmene rodu *Pseudomonas* a mykolytické bakterie *Ewingella americana* (Starke et al., 2016). Bakteriální kmeny jsou výrazněji zastoupeny v pozdějších fázích rozkladu dřeva, kdy dochází ke zvýšení obsahu dusíku díky přítomnosti mycelií dřevokazných hub, jako potenciálního zdroje uhlíku a dusíku (Brabcová et al., 2016). Podobné vzorce rozkladu a postupné zvyšování objemu bakteriální populace jsou viditelné i v rozkladu rostlinného opadu (Tláškal et al., 2016). Mikrobiální společenstva z mrtvého dřeva mohou kolonizovat i ostatní lesní habitaty. Saprotrofní houby *Phanerochaete velutina* nebo *Hypholoma fasciculare*, z třídy *Basidiomycetes*, jsou schopné, proniknou mycelií do půdy a podílet se na rozkladu opadu (Baldrian a Valášková, 2008).

V závislosti na vývoji společenstva hub a bakterií na mrtvém dřevě rozlišujeme primární, sekundární, pozdní sekundární kolonizátory a kolonizátory v konečných fázích rozkladu dřeva (Boddy a Watkinson, 1995). V prvotních fázích rozkladu dřeva jsou zastoupeny zejména saprotrofní houby (houby hnědé, bílé a měkké hniloby) tříd *Basidiomycetes* a *Ascomycetes* a bakterie skupin *Acinetobacteria*, *Firmicutes* nebo *Bacteroidetes* (Baldrian, 2017). Lignocelulózový substrát je těmito organismy rozkládán aktivitou extracelulárních enzymů na dostupnější monomery (kapitola 2.4.). Na těchto monomerech se však mohou „přiživit“ ostatní organismy, zejména bakterie v pozdějších stádiích rozkladu. Houby mohou omezit přístup k

rozloženým živinám několika mechanismy, například snížením pH, produkcí oxalátu (kapitola 2.6.3.) (Baldrian et al., 2007).

### 2.6.1 Houby rozkládající dřevní hmotu

Primárními kolonizátory odumřelého dřeva jsou saprotrofní houby měkké a bílé hniloby. Jsou to specializovaní oportunisté, kteří se dostávají na dřevo ve formě spor (Boddy, 2000). Houby měkké hniloby nejsou schopny rozkládat lignin, pouze ho modifikují. Tito kolonizátoři postupně snižují svou abundanci, až jsou zcela nahrazeni sekundárními kolonizátory, kteří se dostávají na mrtvé dřevo také ve formě spor, ale dřevní hmotu rozkládají rychleji a efektivněji. Mezi sekundární a pozdě sekundární kolonizátory řadíme houby hnědé hniloby, které tyto substráty rozkládají efektivněji, přestože jejich ligninolytický systém je redukován. V další fázi následují houby bílé hniloby, které mají enzymatický aparát uzpůsobený na degradaci všech složek dřeva, včetně ligninu, shrnuto v tabulce 3. Přítomnost jednotlivých skupin hub lze odhadnout z rozdílné struktury rozkládaného dřeva. Zatímco houby hnědé hniloby způsobují hnědé zbarvení dřeva, které se blokově rozpadá, přítomnost hub bílé hniloby se projevuje intenzivním světlým zbarvením dřeva získávajícím vláknitou strukturu (obr. 4). V konečných fázích rozkladu dřeva, kdy je vysoký podíl dusíku a nižší obsah ligninu díky přítomnosti hub bílé hniloby, dominují ektomykorhizní houby (Boddy a Heilmann-Clausen, 2008). Kromě saprotrofních a ektomykorhizních hub je zde i zastoupení lichenizovaných nebo mykoparazitických hub.



Obrázek 4 (A) Rozklad dřeva houbami hnědé hniloby (akumulace hnědého modifikovaného ligninu), (B) houbami bílé hniloby (lignin je rozložen a v posledních fázích rozkladu zůstává celulóza), převzato z Peralta et al., 2016).

Vývoj houbového společenstva (zastoupení jednotlivých tříd, řádů, druhů) je ovlivňováno změnami biochemických vlastností rozkládajícího se dřeva. Z předchozí studie rozkladu dřeva v oblasti národní přírodní rezervace Žofínský prales vyplývá, že

složení houbového společenstva je ovlivňováno délkou rozkladu dřeva – fází rozkladu, koncentrací dusíku a pH. Dominantními houbami byla *Basidiomycota* (67,8%) a *Ascomycota* (30,4%), poté *Mortierellomycotina* (1,28%) a *Mucoromycotina* (0,45%). Velmi omezeně byla zastoupena *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Entomphthoromycota* a *Kicxellomycotina* (sekvence obsahovaly méně než 0,05%). Zatímco *Basidiomycota* převažovala v tlejících kmenech jedle bělokoré (*Abies alba*) a smrku ztepilého v pozdních fázích rozkladu, *Ascomycota* byla pozorována v kmenech buku lesního (*Fagus sylvatica*) v počátečních stádiích a u smrku ztepilého i v následující fázi. Mezi nejhojnější druhy patřily: *Ganoderma applanatum* (5,3% všech sekvencí), *Hyphodontia aspera* (5,2%), *Resinicium furfuraceum* (4,7%), *Megacollybia marginata* (3,6%) a *Fomitopsis pinicola* (3,1%). Z nejhojnějších druhů (11) patřilo 9 mezi houby bílé hniloby. Ze všech houbových sekvencí patřila většina houbám bílé hniloby (52%), saprotrofy (32%), ektomykorrhizální houby (4,7%) a houby hnědé hniloby (3,8%)(Baldrian et al., 2016).

Skupina hub	Důležité vlastnosti
<b>Houby bílé hniloby</b> White-rot fungi (WRF) ligninolytické houby	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; degradace ligninu na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, degradace celulózy a hemicelulózy</li> <li>&gt; produkují ligninolytické, celulolytické a hemicelulolytické enzymy a další CAZYmy</li> <li>&gt; selektivní delignifikátoři: preferenčně rozkládají lignin (SD - selective delignifiers)</li> <li>&gt; neselektivní delignifikátoři: rozkládají rovnocenně všechny složky dřeva (ND - nonselective delignifiers)</li> <li>&gt; <i>Basidiomycotina</i>: degradují měkké i tvrdé dřevo, i <i>Ascomycotina</i>: preferují tvrdá dřeva <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (SD), <i>Physisporinus rivulosus</i> (SD), <i>Phlebia radiata</i> (SD), <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (SD), <i>Trametes versicolor</i> (ND), <i>Ganoderma applanatum</i> (SD, ND), <i>Heterobasidion annosum</i> (SD, ND)</li> </ul>
<b>Houby hnědé hniloby</b> Brown-rot fungi (BRF) celulolytické houby	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; degradace celulózy a hemicelulózy, modifikace ligninu</li> <li>&gt; neprodukují ligninolytické enzymy a celobiohydrolázu (kromě <i>Coniophora puteana</i>)</li> <li>&gt; indikací degradace je produkce kyslíkových radikálů a hemiceluláz</li> <li>&gt; aktivně snižují pH na úroveň nižší než WRF</li> <li>&gt; hnědé zbytky dřeva zůstávají v prostředí dlouhodobě</li> <li>&gt; <i>Basidiomycotina</i>: preferenčně degradují měkké dřevo <i>Anthrodia carbonica</i>, <i>Gloeophyllum trabeum</i>, <i>Laetiporus sulfureus</i>, <i>Tyromyces palustris</i>, <i>Lentinus lepideus</i>, <i>Polyporus schweinitzii</i>, <i>Piptoporus betulinus</i>, <i>Poria placenta</i>, <i>Serpula lacrymans</i></li> </ul>
<b>Houby měkké hniloby</b> Soft-rot fungi (SRF) celulolytické houby	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; degradace celulózy a hemicelulózy, omezená degradace a modifikace ligninu</li> <li>&gt; pomalá rychlost degradace dřeva ve srovnání s WRF a BRF</li> <li>&gt; limitované znalosti lignocelulolytického systému</li> <li>&gt; převážně vlhká prostředí, lignocelulóza v půdě</li> <li>&gt; <i>Ascomycotina</i> and <i>Deuteromycotina</i> (i basidiomyceta <i>Inonotus hispidus</i>) <i>Phialophora</i>, <i>Ceratocystis</i>, <i>Hypoxylon</i>, <i>Ustulina</i>, <i>Chaetomium</i></li> </ul>

Tabulka 3 Hlavní vlastnosti dřevokazných hub, převzato z (Baldrian a Valášková, 2008).

## 2.6.2 Bakterie podílející se na rozkladu dřeva

Bakteriální společenstva jsou schopná rozkládat dřevo za anaerobních i aerobních podmínek, ale na rozdíl od houbových společenstev nejsou schopna kolonizovat velké plochy, nevytváří mycelia (Clausen, 1996). Bakterie kolonizující dřevo pocházejí z půdy, ze vzduchu, dřeva, hub a jiných organismů. Nejvýznamnější zdroj bakteriálních populací je uváděna půda, která obsahuje množství bakterií s vysokou diverzitou (Johnston et al., 2016). Vzduchem se bakterie (i houby) mohou šířit pomocí spor, dešťové srážky vytváří bioaerosoly, které pomáhají k disperzi těchto spor a potenciální kolonizaci dřeva (Huffman et al., 2013). Příkladem kolonizace dřeva bakteriemi pomocí hub popisuje Nazir et. al, z roku 2014. Bakterie *Burkholderia terrae* BS001 využívá pro kolonizaci dřeva migraci houbových hyf *Phanerochaete velutina* (Nazir et al., 2014). Mezi jiné organismy, pomocí nichž bakterie kolonizují dřevo, patří například kůrovci (Mercado et al., 2014). Funkce bakterií osidlujících dřevo může být velmi různorodá. U řady bakterií byla potvrzena schopnost podílet se na dekompozici dřeva (Lladó et al., 2017), komenzální bakterie mohou využívat houbové exsudáty a produkty houbového metabolismu uvolněných při rozkladu dřeva (Hervé a Cortesero, 2016), utilizací organických kyselin produkovaných houbami (Daniel et al., 2007; Hervé a Cortesero, 2016) nebo jen využívat schopnosti přežít v podmínkách nízkého pH vytvořeného houbami kolonizujícími dřevo (Valášková et al., 2009).

Bakteriální společenstva patří, společně s dřevokaznými houbami měkké hniloby, mezi primárními dekompozitory dřeva. S houbami mohou kooperovat (zejména s houbami rozkládajícími lignin) nebo rozkládat substrát samostatně (Clausen, 1996). V průběhu jednotlivých fází rozkladu dřeva jsou bakteriální společenstva ovlivňována složením houbového společenstva. Vývoj bakteriálního společenstva na mrtvém dřevě závisí také na relativní vlhkosti, pH a také na poměru dusíku a uhlíku v rozkládajícím se dřevě (Tláškal et al., 2017). V průběhu rozkladu dřeva dochází k nárůstu bakteriální biomasy a zvyšování diverzity. Podobné změny v bakteriálním společenstvu byly zjištěny i v rámci dekompozice rostlinného opadu (Tláškal et al., 2016). Dynamika vývoje jednotlivých bakteriálních skupin však může záviset i na druhu stromu (Hoppe et al., 2015; Kielak et al., 2016; Rinta-Kanto et al., 2016). Nejčastěji se vyskytující bakteriální kmeny na mrtvém dřevě byly nalezeny *Actinobacteria*, *Firmicutes* (na stromech *Fagus sylvatica* a *Picea abies*), dále pak

*Bacteroides* (na stromech *Picea abies*) a *Gammaproteobacteria* v tlejících kmenech *Fagus sylvatica* (Hoppe et al., 2015). Diverzita bakteriálního společenstva může nesorměrná v rámci jednoho studovaného kmene. Zhang et al., 2008 detekovali největší bakteriální diverzitu v prostředních částech dřeva.

Během rozkladu dřeva dochází ke snižování pH, což má (společně s vlivem extracelulárních enzymů hub) významný vliv na bakteriální společenstvo. Objevují se bakteriální společenstva tolerující nízké pH. V konečných fázích rozkladu dochází ke zvyšování bohatosti a diverzity bakteriálních společenstev, naopak houbová společenstva diverzitu a množství snižují (Laiho a Prescott, 1999; Mäkinen et al., 2006; Parton et al., 2007). V pozdějších stádiích rozkladu u těžce kolonizovaného dřeva se vyskytuje vysoké množství houbového mycelia, které může být použito jako sekundární zdroj živin pro mikrobiální společenstva vyskytující se v rozkládaném dřevě (Colpaert et al., 1996) Dominantními rozkladači jsou zde bakterie (Brabcová et al., 2018, 2016). Bakterie fixující dusík přítomné v rozkládajícím se myceliu mohou být dalším zdrojem N v mrtvém dřevě. A přispět tak ke snížení C/N poměru. Fixace dusíku je často spojena s metylotrofií (Folman et al., 2008.; Voro'ev et al., 2009). Methanol a metan jsou jedním z produktů rozkladu ligninu. Tento způsob výživy tak může být také důležitým aspektem utváření mikrobiálního společenstva v rozkládajícím se dřevě (Lenhart et al., 2012).

### 2.6.3 Houbové a bakteriální interakce

K interakcím houbových a bakteriálních společenstev dochází kvůli získání živin ze stejného substrátu. Bakterie mohou využít jako zdroj živin látky, které byly vyprodukovány extracelulárními enzymy dřevokazných hub pro degradaci některého z rostlinných polymerů, zejména v posledních stádiích rozkladu. Tento způsob interakce se označuje jako mikrobiální kleptoparasitismus. Mohou rovněž využívat stejné látky jako houby nebo, zejména v pozdních fázích rozkladu, využívat odumřelé části mycelia jako další zdroj živin (Boddy, 2000).

Typ interakce (kompetice, antagonismus nebo kooperace) mezi houbovými a bakteriálními společenstvy závisí na podmínkách prostředí jako je pH, vlhkost, struktura substrátu, zastoupení rostlinných polymerů, oligosacharidů, atd. (Folman et al., 2008). Bakteriální společenstva mohou využívat produktů extracelulárních enzymů, které jsou produkovány dřevokaznými houbami. Podle experimentu Schneidera et al., z roku 2010 došlo po produkci extracelulárních enzymů houbou, mezi *Pectobacterium carotovorum* a *Aspergillus nidulans* k formě antagonismu. Bakterie zvýšila rychlost růstu a tím negativně ovlivnila houbu (Schneider et al., 2010).

Mezi synergistické příklady mezi houbovými a bakteriálními společenstvy je například využívání mrtvých houbových, či bakteriálních buněk. Mrtvé houbové mycelium obsahuje ve svých buněčných stěnách polysacharidy jako je chitin, dále pak lipidy a proteiny. Mycelium tedy představuje v konečných fázích rozkladu dřeva významný zdroj uhlíku a dusíku, který využívají bakteriální společenstva (Baldrian et al., 2013; Cooke a Whipps, 1993). Houby hnědé hniloby také produkují kyselinu šťavelovou, která je ve dřevě a půdě uložena ve formě šťavelanu vápenatého. Tento prvek pak mohou bakteriální společenstva využít jako zdroj vápníku a uhlíku. Mrtvé bakteriální buňky v počátečních fázích rozkladu mohou houbám poskytnout zdroje dusíku (King a Waite, 1979). Půdní bakteriální společenstva redukující síran poskytují železo nezbytné pro houbový růst, které je dřevě v nedostatečném množství (Clausen, 1996).

Dalším příkladem interakce mezi houbami a bakteriemi je mykofagie. Mykofágní bakterie využívají živé houby, ze kterých získávají živiny pro svůj růst. Nejedná se tedy o využití (jako zdroje živin) odumřelých nebo poškozených mycelií a

jiných houbových částí. U některých zástupců se vyvinula forma vzájemné/mutualistické mykofagie, ve které bakterie dodává houbě specifické živiny nebo degradující toxiny (Leveau a Preston, 2008). S přibývajícím studiem bylo zjištěno, že rozhodujícím/preferovaným zdrojem uhlíku pro mykofágní bakterie, je glycerol. Testy byly prováděny pouze v laboratořích, například s bakteriemi *Burkholderia terrae* BS001, *Burkholderia rhizoxinica* a *Rhizopus*, u nichž byly zjištěny geny kódující transportéry glycerolu, spojené s mykofágním životním cyklem. (Haq et al., 2014; Nazir et al., 2013).

Po mykofágní studii studie prokázaly také výskyt obráceného jevu, kdy dřevokazné houby lyzovaly bakteriální buňky (vymizení bakteriální populace po tom, co bylo zaočkováno houbovým inokulem). Příkladem je studie Tsuneda a Thorna z roku 1994, kde bylo zjištěno, že dřevokazné houby lyzují bakteriální kolonie v kultuře, včetně bakteriálních zástupců, kteří degradují mrtvá hárátka (Tsuneda a Thorn, 1995).

Příkladem vzájemně prospěšného vztahu (mutualismus) mezi houbou a bakterií lze uvést již výše zmíněnou bakterii *Burkholderia terrae* BS001, která houbu „chránila“ před působením cykloheximidu (fungicid) nebo metabolitů z antagonistické bakterie *Pseudomonas fluorescens* kmene CHA0. Bakterie *Burkholderia terrae* BS001 v tomto případě získává od houby přístup ke zdrojům živin (popřípadě kolonizaci dřeva) a houba je od bakterie chráněna před působením škodlivých látek (Nazir et al., 2014).

Mezi dřevokaznými houbami různých druhů nebo kmenů dochází také k antagonistickým interakcím, jako je kompetitivní interakce. Kompetitivní interakce je zajišťována například morfologickými změnami (tvorba bariér) nebo metabolickými změnami (produkce antifungálních toxinů, různých metabolitů nebo oxidačních enzymů). Výsledkem je například nahrazení původního mycelia v určité oblasti rozkládaného dřeva, nepůvodním (Shipcott et al., 2016). Dalším typem kompetitivní interakce mezi houbami je mykoparazitismus, který se dále dělí na nekrotrofní (mykoparazit získává živiny z umírajícího nebo mrtvého mycelia) a na biotrofní (využití živin z živého mycelia). Houby mohou parazitovat také na plodnicích nebo sporách (Jeffries, 1995).

### 3 Cíle práce

Cíle diplomové práce byly:

- Popsat strukturu houbového společenstva na vybraných kmenech v oblasti Národní přírodní rezervace Žofínský prales.
- Zhodnotit vývoj tohoto houbového společenstva v čase (2013-2017).
- Zhodnotit rozkladné vlastnosti hub izolovaných z tlejících kmenů.

Pracovní hypotéza:

- Mikrobiální (houbová) komunita se během rozkladu mrtvého dřeva vyvíjí.



## 4 Materiál a metody

V kapitolách níže jsou popsány metody a materiály použité ve třech experimentech, které probíhaly v letech 2017-2019.

Prvním experimentem byla izolace hub z plodnic na tlejícím dřevě. Materiálem byly plodnice hub rostoucích na vybraných tlejících kmenech v Národní přírodní rezervaci Žofínský prales. Z plodnic byly houby izolovány do čistých kultur, prováděla se taxonomická identifikace na základě sekvenace ITS2. Z homogenizovaných plodnic se stanovovaly chemické parametry mycelia (obsah uhlíku, dusíku, fosforu, C/N poměr, pH) a aktivita extracelulárních enzymů podílejících se na rozkladu dřevní hmoty. Experiment měl za cíl získat plodnice hub z tlejícího dřeva v čistých kulturách k určení základních vlastností těchto hub a k analýze jejich degradačních schopností. Část získaných izolátů byla v rámci jiného experimentu použita pro celkovou analýzu genomu saprotrofních hub.

Ve druhém experimentu se analyzovala struktura houbového společenstva v tlejícím dřevě. Materiálem byly vzorky dřeva ve formě pilin odebrané ze spadných tlejících kmenů v Národní přírodní rezervaci Žofínský prales. Materiál byl použit pro identifikaci a analýzu houbového společenstva metodou NGS na platformě Illumina MiSeq (2×250 bázi), pro stanovení celkové houbové biomasy měřením obsahu ergosterolu, odhadu mikrobiální aktivity na základě měření extracelulárních enzymových aktivit rozkladu lignocelulózy, a změření základních chemických parametrů vzorku (uhlíku, dusíku, fosforu a pH). Cílem tohoto experimentu bylo popsat strukturu a vývoj houbového mikrobiálního společenstva ve vybraných kmenech a zhodnotit složení houbového společenstva v čase u 4 věkových kategorií vybraných kmenů.

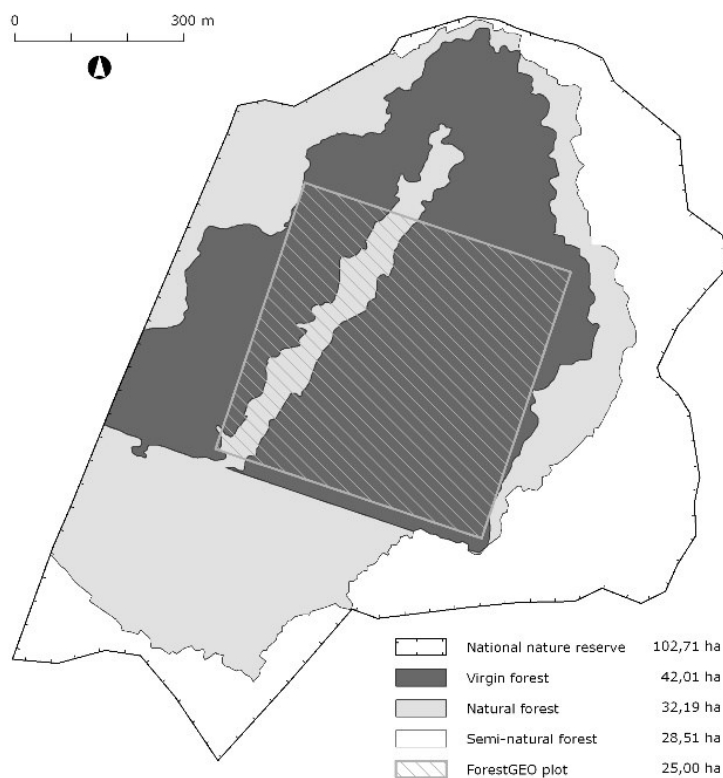
V experimentu 1 i 2 bylo použito stejných metod, optimalizovaných vždy pro daný typ materiálu.

Ve třetím experimentu byla porovnána houbová společenstva tlejícího dřeva odebraného v letech 2013 a 2017. Jednalo se vždy o porovnání identických kmenů. Cílem analýzy bylo popsat vývoj houbového společenstva tlejícího dřeva v čase.

## 4.1 Lokalita a vzorkování

Sběr materiálu probíhal v Národní přírodní rezervaci Žofínský prales (786 m.n.m), která se nachází v Novohradských horách v České republice (48.6652942N, 14.7065467E). Jedná se o přirozený lesní ekosystém, který je od roku 1838 bez zásahu člověka. Celková rozloha činí 102,71 ha (obr. 5) a z toho se vzorkovalo na ploše 25,00 ha (pralesy.cz, ForestGEO). Sběr plodnic hub a vzorků dřeva probíhal na vybraných ležících tlejících kmenech buku (*Fagus sylvatica*), jedle (*Abies alba*) a smrku (*Picea abies*). Výběr vhodných kmenů zohledňoval základní metrická data: rok, kdy strom spadl (stáří), minimální tloušťku kmene 20 cm a druh stromu. Cílem výběru byla homogenita metrických parametrů a zastoupení jednotlivých druhů. Dle roku, kdy byl kmen nalezen ležící, byly rozděleny 4 věkové kategorie:

- ležící více než 32 let (pád před rokem 1975), kategorie: >32let
- ležící 20 – 32 let (pád do roku 1997), kategorie: 20-32let
- ležící 9 – 19 let (pád do roku 2008), kategorie: 9-19let
- ležící 4 – 8 let (pád do roku 2013), kategorie: 4-8let



Obrázek 5 Národní přírodní rezervace Žofínský prales (čtverec vyznačuje oblast, která byla vzorkována)

### 4.1.1 Sběr plodnic hub

Sběr plodnic hub byl prováděn pomocí ruční pilky, kterou se plodnice oddělily z označeného kmene a uložily se do jednotlivých polypropylenových sáčků s číselným označením vzorku plodnice. Pilka se mezi jednotlivými úkony sterilizovala ethanolem. Z plodnic hub se jednalo nejčastěji o rody lesklokorka (*Ganoderma*), troudnatec (*Fomes*) a outkovka (*Trametes*). Vzorky plodnic hub byly převezeny v chladicím boxu do laboratoře a uchovávány ve 4 °C (do 24 hodin použity pro izolaci hub. Zbytek plodnice byl homogenizován, lyofilizován, uchováván v mrazáku při -20°C a dále zpracováván příslušnými metodami. Pro měření enzymatické aktivity byly plodnice nadrceny v tekutém dusíku v misce s tloučkem, přesety přes síto, umístěny do 50 ml falkon a znovu vráceny do -20°C mrazáku.

### 4.1.2 Odběr tlejícího dřeva

Sběr vzorků rozkládajícího se dřeva na vybraných kmenech byl prováděn vrtáním vrtačkou s 40 cm dlouhým vrtákem s průměrem 5mm. Nejprve se změřila délka vybraného kmene a rovnoměrně (podle délky kmene) se vybrala 4 místa, kde se odebraly vzorky (dvě místa pro vzorek A a dvě místa pro vzorek B). Mezi jednotlivými kmeny se vrták sterilizoval ethanolem. Odebrané vzorky dřeva byly dány do jednotlivých polypropylenových sáčků s číselným označením vzorku a udržovány na ledu. V laboratoři se u vzorků stanovila vlhká a po lyofilizaci suchá hmotnost, lyofilizované vzorky byly uchovávány v mrazáku při -20°C a použity k dalším analýzám. Odběry vzorků, které zpracovávám v této diplomové práci, byly prováděny v září v roce 2017. Samostatně ze vzorku A a vzorku B se prováděla pouze izolace DNA, ostatní metody se prováděly ze vzorků spojených AB.

## 4.2 Izolace a kultivace hub

Pro izolaci čistých kultur hub z plodnic bylo použito médium MERBS. Z celkových 60 odebraných vzorků plodnic ze Žofinského pralesa bylo kvůli malému rozměru plodnic a nevhodnosti sesbíraného materiálu izolováno 47 vzorků. Z nich se podařilo získat 22 čistých kultur. Izolace a následující kultivace probíhaly na MERBS agarovém médiu v temnu při 25°C. Pro další přeočkování čistých kultur bylo použito MES médium a misky byly kultivovány stejným způsobem. Úspěšně izolované kultury byly uloženy do CCBAS (*Culture Collection of Basidiomycetes*) s příslušným označením.

- **MERBS médium:** 20,00 g/l malt extrakt, 0,05g/l bengálská červeň, 15,00 g/l agar a 2,00 g/l antibiotika streptomycinu, přidáváno do média po sterilizaci a vychladnutí agaru na 55°C
- **MES médium:** 20,00 g/l malt extrakt, 15,00 g/l agar a 2,00 g/l antibiotika streptomycinu

## 4.3 Biochemické metody

### 4.3.1 Stanovení enzymatické aktivity plodnic hub

Celkově byla stanovována enzymatická aktivita: 1,4- $\beta$ -glukosidázy, fosfatázy, chitinázy, celobiohydrolázy, 1,4- $\alpha$ -glukosidázy, 1,4- $\beta$ -xylosidázy, 1,4- $\beta$ -manosidázy, 1,4- $\beta$ -galaktosidázy, lipázy (triacylglycerolacylhydroláza),  $\beta$ -D-glukuronidázy, 1,4- $\alpha$ -galaktosidázy, lakázy, Mn-peroxidázy, oxidázy, peroxidázy, endo-1,4- $\beta$ -glukanáza, endo-1,4- $\beta$ -xylanázy.

Enzymová aktivita s využitím fluorescenčně značených substrátů (MUF) byla měřena spektrofotometricky na přístroji Infinitive 200 (Tecan Trading AG, Switzerland) za použití fluorescenčně značených substrátů v mikrotitrační 96-jamkové destičce, není-li uvedeno jinak (VERKON s.r.o., CZ). Byly zjišťovány aktivity extracelulárních enzymů podílejících se na degradaci dřeva a organické hmoty (obr. 6):

- 1,4- $\beta$ -glukosidázy, fosfatázy, chitinázy, celobiohydrolázy, 1,4- $\alpha$ -glukosidázy, 1,4- $\beta$ -xylosidázy, 1,4- $\beta$ -manosidázy, 1,4- $\beta$ -galaktosidázy, lipázy (triacylglycerolacylhydroláza),  $\beta$ -D-glukuronidázy, 1,4- $\alpha$ -galaktosidázy

Pro stanovení hodnot jednotlivých MUF substrátů, bylo do 20ml octanového pufru 50mM, pH 5 (2,78g, 900  $\mu$ l, 1000 ml destilované vody) přidáno 0,1g vzorku plodnice houby a vše bylo promícháno mlýnkem Ultra-Turrax T (IKA - WERKE GMBH & CO. KG) po dobu 20 sekund. Pro stanovení aktivity těchto enzymů nebylo nutné vzorky odsolovat. Mezi jednotlivými vzorky byl mlýnek promýván destilovanou vodou. Měření probíhalo v mikrotitrační 96-jamkové destičce. Multikanálovou pipetou o objemu 40  $\mu$ l byly napipetovány příslušné enzymové substráty označované zkratkou MUF (tabulka 4). Do jamek pro měření MUG a MUGP bylo navíc přidáno 20  $\mu$ l DMSO. Následně byl zamíchaný homogenizovaný vzorek plodnice houby přidán multikanálovou pipetou v objemu 200  $\mu$ l do jamek na destičce a destička byla udržována v inkubátoru při teplotě 40 °C, aby nedošlo k odpaření vzorku. Kalibrační řada byla připravena ředěním 1 mM roztoku MUF (metylbellyferol). Vzorek byl změřen na spektrofotometru Infinitive 200 (Tecan Trading AG, Switzerland) se softwarem Magellan po 5 minutách a po 125 minutách při excitační vlnové délce 355 nm a emisní vlnové délce 460 nm. **Princip reakce:** Při měření se stanovuje enzymová aktivita, kdy enzymy štěpí speciálně připravený

substrát. Měří se pak fluorescence látky, která vznikla odštěpením (odštěpená má fluorescenci, vázaná ne).

SUBSTRÁT	ZKRATKA	ENZYM
2,75 mM 4-metylbellyferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid	MUFG	1,4- $\beta$ -glukosidáza
2,75 mM 4-metylbellyferyl-fosfát	MUFP	fosfatáza
1,00 mM 4-metylbellyferyl-N-acetylglukosaminid	MUFN	chitináza
2,50 mM 4-metylbellyferyl-N-cellobiopyranosid	MUFC	celobiohydroláza
2,50 mM 4-methylumbellyferyl $\alpha$ -D-glukopyranosid	MUFaG	1,4- $\alpha$ -glukosidáza
2,50 mM 4-metylbellyferyl- $\beta$ -D-xylopyranosid	MUFX	1,4- $\beta$ -xylosidáza
2,50 mM 4-metylbellyferyl- $\beta$ -D-mannopyranosid	MUFM	1,4- $\beta$ -manosidáza
2,50 mM 4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid	MUFL	1,4- $\beta$ -galaktosidáza
2,50 mM 4-methylumbellyferyl-caprylát	MUFY	lipáza
2,50 mM bis-4-metylbellyferyl-glukuronid	MUFU	$\beta$ -D-glukuronidáza
2,50 mM 4-methylumbellyferyl- $\alpha$ -D-galaktopyranosid	MUFaL	1,4- $\alpha$ -galaktosidáza

Tabulka 4 Tabulka s názvy, koncentracemi a zkratkami jednotlivých substrátů pro měření extracelulárních enzymů.

1	1	1	1	1	1	2	2	2		1	2
MUFG	MUFG	MUFG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFG	MUFG	MUFG			
1	1	1	1	1	1	2	2	2		1 +10ul	2 +10ul
MUFP	MUFP	MUFP	MUF L	MUF L	MUF L	MUFP	MUFP	MUFP		MUF1/100	MUF1/100
1	1	1	1	1	1	2	2	2		1 +20ul	2 +20ul
MUFC	MUFC	MUFC	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUFC	MUFC	MUFC		MUF1/100	MUF1/100
1	1	1				2	2	2		1 +50ul	2 +50ul
MUFX	MUFX	MUFX				MUFX	MUFX	MUFX		MUF1/100	MUF1/100
1	1	1	2	2	2	2	2	2		1 +20ul	2 +20ul
MUFM	MUFM	MUFM	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFM	MUFM	MUFM		MUF 1/10	MUF 1/10
1	1	1	2	2	2	2	2	2		1 +50ul	2 +50ul
MUFN	MUFN	MUFN	MUF L	MUF L	MUF L	MUFN	MUFN	MUFN		MUF 1/10	MUF 1/10
1	1	1	2	2	2	2	2	2		1 +10ul	2 +10ul
MUFU	MUFU	MUFU	MUF Y	MUF Y	MUF Y	MUFU	MUFU	MUFU		MUF	MUF
1	1	1				2	2	2		1 +20ul	2 +20ul
MUF aL	MUF aL	MUF aL				MUF aL	MUF aL	MUF aL		MUF	MUF

Obrázek 6 Rozložení vzorků na mikrotitrační destičce pro měření enzymů MUF (zeleně vzorek 1 s kalibrační křivkou, žlutě vzorek 2 s kalibrační křivkou).

Enzymová aktivita oxidativních enzymů (lakáza, MnP, oxidáza, peroxidáza) se stanovuje v odsolených vzorcích rozpuštěných ve 20ml octanového pufru 50mM, pH 5. K odsolení byly použity kolonky Sephadex<sup>TM</sup> G-25 M (GE-Healthcare, United Kingdom), nejprve bylo nutné 50 ml falkony s jednotlivými vzorky centrifugovat po dobu 5 minut na 5000rpm, do kolonky byl nanesen supernatant vzniklý centrifugováním. Postup odsolování byl následující:

1. přefiltrovat přes kolonku destilovanou vodu 3,5 ml, kterou nezachycujeme (slouží k pročištění kolonky od komerčního roztoku),
2. přefiltrovat 2,5ml vzorku, který také nezachycujeme,

3. přemístit kolonky se vzorky do příslušných 15 ml falkon a přefiltrovat 3,5 ml destilované vody a vzorek zachytit,
4. dvakrát přefiltrovat 3,5ml destilované vody určené k vyčištění kolonky. Takto získané odsolené vzorky byly udržovány v mrazáku při – 20°C .

**Lakázová aktivita** byla měřena v mikrotitrační 96-jamkové destičce, ve 4 technických replikátech. Do jamek multikanálovou pipetou napipetováno 50 µl vzorku, 150 µl citrát-fosfátového pufru a 50 µl ABTS (0,04g ABTS, 50ml destilované vody). Po přidání ABTS byla mikrotitrační destička ihned vložena do spektrofotometru Infinitive 200 (Tecan Trading AG, Switzerland) a lakázová aktivita měřena po 30 sekundách pro hodně reaktivní vzorky a po 12 minutách pro méně reaktivní vzorky při vlnové délce 420 nm. **Princip reakce:** Lakáza oxiduje skupiny v ligninu a tím pomáhá jeho degradaci. Při měření vzniká oxidací ABTS měřitelné zbarvení, čím je barevnější, tím je vyšší aktivita.

- citrát-fosfátový pufr (pH 5): 2,1g citrátové kyseliny, monohydrát, 100ml destilované vody
- ABTS (0,08%): 0,04g ABTS, 50ml destilované vody

Měření **MnP, oxidázové, peroxidázové aktivity** v mikrotitrační 96-jamkové destičce, ve 4 technických replikátech pro každý enzym. Po přípravě jednotlivých substrátů (AR, AP a AB, tabulka 5), bylo multikanálovou pipetou přidáno do jamek 50 µl vzorku a 200 µl substrátů a ihned měřeno ve spektrofotometru Infinitive 200 (Tecan Trading AG, Switzerland) po 3 minutách pro velmi reaktivní vzorky a po 12 minutách pro méně reaktivní vzorky při vlnové délce 590 nm. **Princip reakce na manganové peroxidáze:** Manganová peroxidáza oxiduje vazby molekule ligninu, Při měření oxidativně propojí DMAB a MBTH za vzniku fialového barviva.

	AR (MnP)	AP (Per)	AB (Ox)
Sukcinát-laktátový pufr	10,5 ml	10,5 ml	10,5 ml
DMAB	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
MBTH	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml
MnSO4	0,7 ml	-	-
Peroxid	0,7 ml	0,7 ml	-
EDTA	-	0,7 ml	0,7 ml
Destilovaná voda	-	-	0,7 ml

Tabulka 5 Složení substrátů pro měření MnP, oxidázy (Ox) a peroxidázy (Per).

- Peroxid se připravuje vždy čerstvý před každým novým měřením (50  $\mu$ l 30% peroxidu ( $H_2O_2$ ) do 85 ml destilované vody).
- Sukcinát-laktátový pufr (100mM, pH 4,5): 0,146g sukcinátové kyseliny, DL-laktátové kyseliny, sodná sůl 60%, 100 ml destilované vody,
- DMAB (25mM, pH 6,5): 0,0826g, 20 ml fosfátového pufru,
- MBTH (1mM): 0,0043g MBTH, 20 ml destilované vody
- $MnSO_4$  (2mM): 0,016g  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ , 50 ml destilované vody
- EDTA (2mM): 0,074g  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ , 50 ml destilované vody

Pro stanovení **endo-1,4- $\beta$ -glukanázy** a **endo-1,4- $\beta$ -xylanázy** (Megazyme, Irsko) aktivity byly použity 1,5 ml mikrozkumavky (Fisher Scientific, spol. s.r.o., CZ), pro každý vzorek (3 technické replikáty) a 2 kontrolní vzorky destilované vody. Do mikrozkumavky se přidalo 150  $\mu$ l vzorku a 150  $\mu$ l substrátu (azo-CM celulóza a azo-xylan), vše se 5 sekund vortexovalo a 5 sekund centrifugovalo na 10000 rpm, dále se vzorky daly do termobloku na 45 minut a 40°C. Po vyjmutí vzorků z termobloku bylo přidáno 750  $\mu$ l precipitantu, ihned vortexováno a centrifugováno po 10 minut na 10000 rpm. Do mikrotitrační 96-jamkové destičky bylo napipetováno 200  $\mu$ l jednotlivých vzorků a změřeno na spektrofotometru Infinite 200 (Tecan Trading AG, Switzerland) při vlnové délce 595 nm. Princip reakce: Na celulóze a xyланu je navázaná karboxymetyl skupina. Při jejím odštěpením činností enzymů se uvolňuje barvivo. Aktivita enzymů byla vyjádřena v  $nM \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$ .

- precipitant (pH 5): v 200 ml destilované vody rozpuštěný 40g octan sodný trihydrát a 4g octan zinečnatý + 800 ml 95% ethanolu



### **4.3.2 Enzymové aktivity v tlejícím dřevě**

Pro stanovení enzymatické aktivity vzorků rozkládajícího se dřeva, bylo použito stejných metod, jako u měření enzymatické aktivity plodnic hub, včetně spektra stanovovaných enzymů. Vzorky rozkládajícího se dřeva, ve formě lyofilizovaných pilin, udržované v mrazáku v  $-80^{\circ}\text{C}$ , byly namlety na jemný prášek pomocí ultra odstředivého mlýnu ZM 200 (RETSCH®, CZ). Mezi jednotlivými vzorky byl mlýnek rozebrán, omýván destilovanou vodou a sterilizován pomocí ethanolu, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci. Takto namleté vzorky, neustále udržované v chladu na ledu, byly naváženy do 50 ml falkon a stejně jako u plodnic hub, zmixovány s acetátovým pufrům pomocí mlýnku (stejný postup jako u předchozí extrakce).

### **4.3.3 Stanovení fyzikálně-chemických vlastností tlejícího dřeva a plodnic**

#### **4.3.3.1 Obsah dusíku a uhlíku (C/N poměr)**

Pro stanovení obsahu uhlíku a dusíku, C/N poměru bylo naváženo do 15 ml falkon 1 g lyofilizovaného, mletého a přesátého vzorku (vážení zaznamenáno v tabulce na tři desetinná místa). Pro vážení vzorků byly použity váhy (VWR Collection, CZ) a jednotlivé pomůcky byly mezi jednotlivými vzorky sterilizovány ethanolem. Navážené vzorky byly odeslány do externí laboratoře a udržovány ve  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3.3.2 Obsah fosforu**

Pro analýzu obsahu fosforu v plodnicích hub bylo naváženo v rozmezí o 0,01g až do 0,1g lyofilizovaného, mletého a přesátého vzorku (přesné hodnoty zaznamenány v tabulce) do 15 ml falkon. Bylo připraveno 10 standartů pro kalibrační křivku. Celkový fosfor byl detekován na spektrofotometru (VERKON, CZ) při vlnové délce 610 nm.

#### **4.3.3.3 Měření pH**

Na měření pH bylo naváženo 0,5g vzorku plodnic/dřeva do 50 ml falkon, následně bylo napipetováno k jednotlivým vzorkům 10 ml destilované vody a vzorky se nechaly třepat po dobu 4 hodin na orbitální třepačce v temnu při teplotě  $25^{\circ}\text{C}$ . Po 4 hodinách se vzorky nechaly v klidu a pH metrem (P-lab, CZ) se měřilo pH v supernatantu. Mezi jednotlivými měřeními se pH metr omýval destilovanou vodou.

#### 4.3.3.4 Stanovení obsahu ergosterolu ve vzorcích rozkládajícího se dřeva

Biomasa hub ve dřevě byla vyjádřena obsahem ergosterolu. Ergosterol je lipid, který se specificky vyskytuje v buněčných membránách hub. Byl stanovován ve 119 směsných vzorcích (AB) rozkládajícího se dřeva. Tyto vzorky byly lyofilizované, namleté na jemný prášek a do analýzy udržované v - 80°C mrazáku.

Bylo naváženo 0,5 g vzorků, udržovaných v chladu, do skleněných vialk EPA o objemu 20ml (VERKON, CZ). Dále bylo přidáno 3 ml KOH (10% roztok v methanolu) a 1 ml cyklohexanu. Vzorky byly vloženy do lázně s ultrazvukem (70 °C 2x20 minut). Do každého vzorku bylo napipetováno 1 ml destilované H<sub>2</sub>O a 2 ml cyklohexanu, vše bylo 30 sekund vortexováno a 5 minut centrifugováno na 3500 rpm. Do čistých ampulek byl odebrán supernatant, k původním vzorkům byly napipetovány 2 ml cyklohexanu (2x). Celkově bylo odebíráno třikrát a získáno 6-7 ml supernatantu, který byl zamražen. Supernatant byl odpařen dusíkem do sucha, byl přidán 1 ml methanolu a 30 sekund vortexován, 20 minut se nechaly vzorky v lázni na 40 °C a následně se 30 vortexovaly a 1 ml se přepipetoval do 1,5 ml mikrozkušavek. Mikrozkušavky se centrifugovaly 3 minuty na 6000 rpm a 800 µl vzorku se přepipetovalo do menších skleněných ampulek podle postupu Šnajdra et al. (2008). Obsah ergosterolu v připravených vzorcích byl změřen v externí laboratoři.

## 4.4 Molekulárně-genetické metody

### 4.4.1 Izolace DNA u izolátů hub a dřeva

Izolace DNA z izolátů hub a rozkládajícího se dřeva byla provedena pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel, USA). Rozdíly mezi izolací hub a dřeva byly pouze v modifikaci objemů u jednotlivých pufrů, změna času vortexování a centrifugace.

**Izolace DNA u hub z plodnic** pro taxonomickou identifikaci byla provedena ze zmraženého materiálu odebraného při zpracování plodnic, vstupním množstvím pro izolaci bylo cca 0,3 g vlhkého vzorku. Pro ověření identity **čistých kultur** byla houbová biomasa opatrně odebrána ze svrchu agarových misek, aby nedošlo k poškození agarové vrstvy. Pro izolaci bylo použito cca 0,3 – 0,5 ml biomasy. Vzorek byl v obou případech navážen přímo do sterilních mikrozkušavek se skleněnými kuličkami, které jsou součástí kitu. Dále bylo postupováno podle příloženého komerčního protokolu.

**Izolace DNA z tlejícího dřeva** byla provedena obdobným způsobem. Celkem bylo izolováno 119 (A a B) vzorků lyofilizovaného na prášek namletého rozkládajícího se dřeva. Do sterilních mikrozkušavek se skleněnými kuličkami, bylo naváženo 150 mg materiálu, u jednotlivých vzorků byla zaznamenána hmotnost naváženého materiálu. Dále pak bylo postupováno podle komerčního protokolu s několika modifikacemi. V prvním kroku byl zvýšen objem SL1 lyzační ho pufru ze 700  $\mu$ l na 750  $\mu$ l, dále pak bylo použito místo vortexu na 5 sekund, FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA) na 2x30 sekund (mezi jednotlivými vortexováními byly vzorky ponechány 5 minut v klidu). Centrifugace vzorků v jednotlivých krocích byly pozměněny z 1 minuty a 11 000 x g na 2,5 minuty a 12 000 x g. Centrifugace v předposledním kroku pro úplné vysušení silikátové membrány byla změněna z 2 minut a 11 000 x g na 5 minut a 12000 x g. V konečném kroku bylo použito 50  $\mu$ l SE pufru pro získání střední koncentrace a výtěžku DNA.

Po změření koncentrace a kvality izolované DNA byl použit spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) dle příloženého návodu. Čistota DNA byla určována poměrem mezi absorbancí při 260 a 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ , 1,5 – 2,0 pro čistou DNA) a poměrem absorbancí při 260 a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ , 1,8 - 1,9 pro čistou DNA).

#### 4.4.2 Ověření identity plodnic hub a hub ze vzorků dřeva

Po změření koncentrace a čistoty DNA na NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Thermo Scientific, USA), byla provedena PCR pro amplifikaci DNA izolátů hub, které se sekvenovaly metodou Sanger v externí laboratoři a pro amplifikaci vzorků dřeva, které se sekvenovaly na platformě Illumina MiSeq (2×250 bází).

Pro PCR izolátů hub (jejich přesná identifikace) byl připraven premix podle protokolu níže v tabulce 6. Do premixu v 96-jamkové destičce se přidal 1 µl DNA. Připravené vzorky byly dány do termocykléru Biometra T-gradient (iBioTech, CZ) podle programu: zahřátí a počáteční denaturace 94 °C, 4 minuty, 35x (denaturace 94 °C 50 sekund, annealing 55 °C 50 sekund, elongace 72 °C 50 sekund), extenze 72 °C, 7 minut. Teplota po skončení cyklů byla v termocykléru 4 °C Biometra T-gradient (iBioTech, CZ). Pro potvrzení úspěšné PCR reakce byly provedena kontrola na agarové elektroforéze MultiSUB Choice Trio (iBioTech, CZ).

Vzorky A a B izolované DNA rozkládajícího se dřeva (pro identifikaci hub) byly nejprve smíchány do jednotlivých mikrozkušavek a u takto smíchaných vzorků byla znovu měřena koncentrace a čistota DNA na NanoDropu 1000. Vzorky byly pipetovány do 96-jamkové destičky podle protokolu níže v tabulce (koncentrace u jednotlivých reaktantů byly upravovány v závislosti na počtu vzorků vstupujících do reakce).

5xQ5 Reaction Buffer	5 µl
PCR Nucleotide Mix (10mM)	0,5 µl
BSA 10 mg/ml	1,5 µl
primer gITS7 (10 pmol/µl)	1 µl
primer ITS4 (10 pmol/µl)	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0,25 µl
5xQ5 HighGC Enhancer	5 µl
templátová DNA (20ng/µl)	1 µl
PCR H <sub>2</sub> O	9,75 µl

Tabulka 6 Komponenty PCR reakce

K amplifikaci mezerníku ITS2 rDNA byly použity primery gITS7 (5'GTGAATCATCGAATCTTTG-3') a ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') již namixované do jednotlivých mikrozkušavek a specifických pro jednotlivé vzorky. PCR H<sub>2</sub>O byla do premixu přidávána první a templátová DNA jako poslední. Vzorky

byly ve 3 technických replikátech. Připravené vzorky byly dány do termocykléru Biometra T-gradient (iBioTech, CZ) podle programu: zahřátí a počáteční denaturace 94 °C, 5 minut, 30x (denaturace 94 °C 30 sekund, annealing 56 °C 30 sekund, elongace 72 °C 30 sekund), extenze 72 °C, 7 minut. Teplota po skončení cyklů byla v termocykléru 4 °C Biometra T-gradient (iBioTech, CZ). Pro potvrzení úspěšné PRC reakce byly provedena kontrola na agarové elektroforéze MultiSUB Choice Trio (iBioTech, CZ).

Pro přípravu 1% agarové elektroforézy MultiSUB Choice Trio (iBioTech, CZ) bylo potřeba 35 ml 1% TAE pufr (Tris-acetát-EDTA) a 0,35g agaru (jednotlivé váhy se lišily podle počtu vzorků, velikosti použité „vany“ a potřebné velikosti agarového gelu).

- 1% TAE (rozpuštěním zásobního 50% TAE pufru v destilované vodě (zásobní 50% TAE pufr 242g Tris base rozpuštěné v 600 ml destilované vody, 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5 M EDTA, zásobní roztok 0,5 M EDTA 93,05 g EDTA disodium rozpuštěné v 500 ml destilované vody, pH 8)).
- 10 µl ethidium bromidu (EtBr, 10 mg/ml) pro vizualizaci vzorků,
- 1 µl hmotnostní standart O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA),
- negativní kontroly (premix s mixem vybraných primerů),
- 1 µl jednotlivých vzorků, které byly ještě před vlastním napipetováním do agarového gelu, smíchány s 1 µl Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA) na parafinu pro lepší aplikaci do agarového gelu

Agarová elektroforéza byla zapnuta na 90V, 500mA a po dobu 30 minut. Poté byl gel vizualizován na příslušném přístroji UltraCAM Digital Imaging System (AMERICAN LABORATORY TRANDING, INC., USA). Takto získané 3 technické replikáty PCR produktů dřeva (u izolátů hub se prováděla pouze elektroforéza), se před vlastní sekvenací smíchaly (příslušné 3 technické replikáty do 1,5 ml mikrozkušavek) a purifikovaly pomocí komerčního protokolu, který je součástí MinElute PCR Purification Kitu (Qiagen, Hilden, Germany).

U purifikovaných PCR produktů byly na fluorometru Qubit (Qubit® 2.0 Fluorometer Life Technologies, Waltham, USA) změřeny přesnější koncentrace a čistoty DNA. Pro měření vzorků na Qubit je nejprve připraven pracovní roztok (1x n

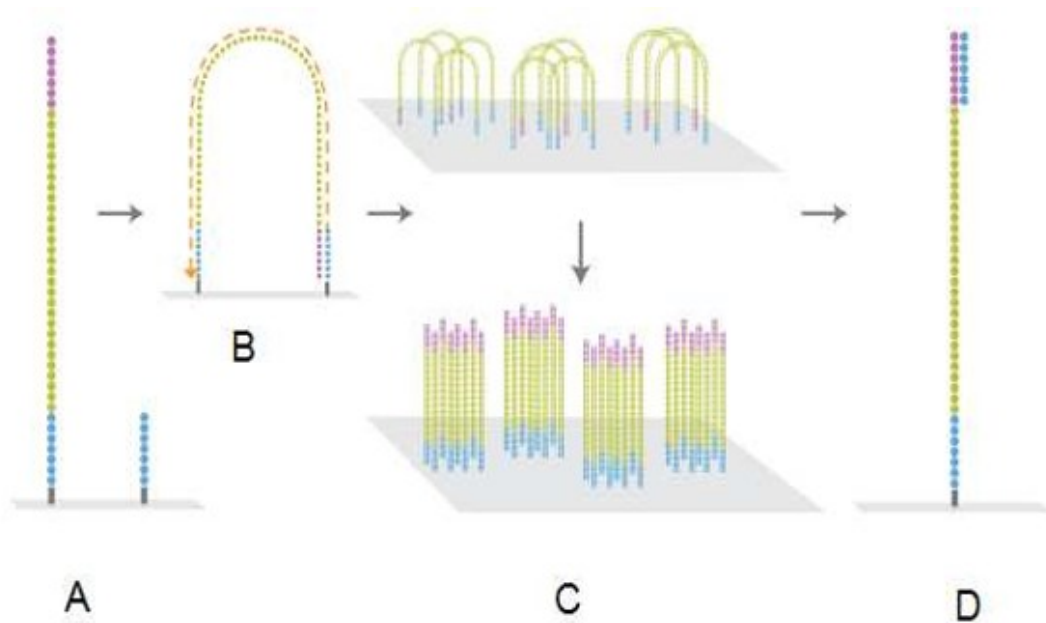
$\mu\text{l}$  Quibit reagent a  $199 \times n$   $\mu\text{l}$  Quibit pufru, kde  $n$  je počet vzorků). S roztokem jsou pak změřeny standardy (190  $\mu\text{l}$  pracovní roztok, 10  $\mu\text{l}$  standardy) a následně ostatní vzorky (199  $\mu\text{l}$  pracovní roztok, 1  $\mu\text{l}$  vzorek). Změřené PCR produkty dřeva byly připravené pro sekvenaci na platformě Illumina MiSeq (2 $\times$ 250 bází). Pro přípravu knihovny byly připraveny ekvimolární směsi ampliconů s použitím TruSeq® DNA PCR-Free LT Kit (Illumina, USA).

#### 4.4.3 Illumina Mi-Seq sekvenování

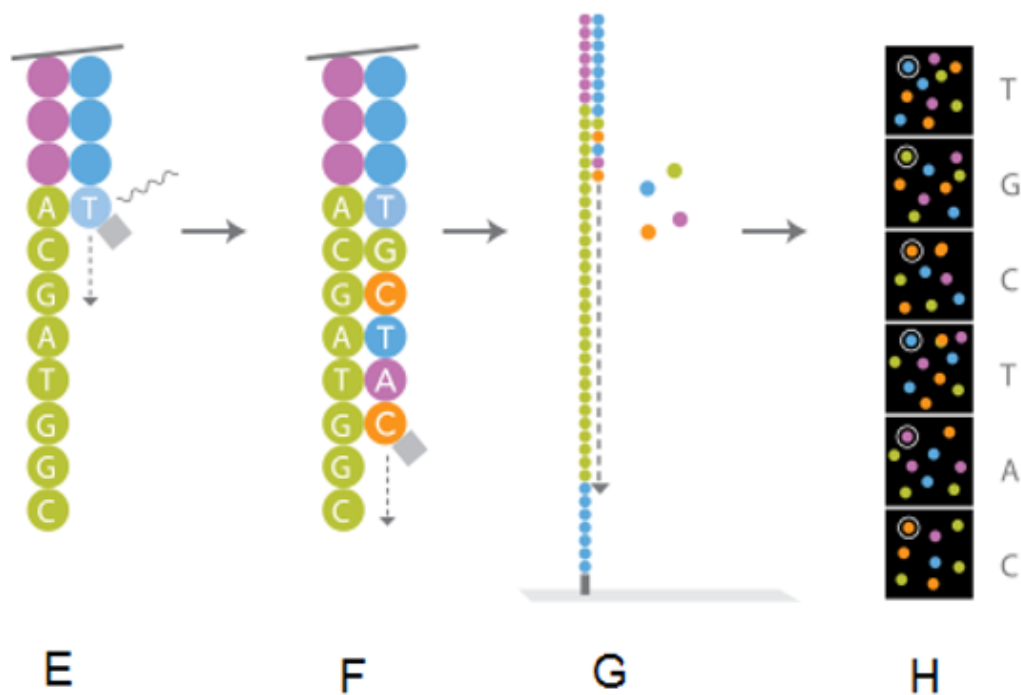
Illumina Mi-Seq používá sekvenční syntézu reverzibilního terminátoru ke komplexnímu sekvenování. V jednom cyklu spojuje generování klastrů, amplifikaci, sekvenování genomické DNA a analýzu dat. Lze si přizpůsobovat délku čtení, sekvenovanou oblast nebo zajistit jednostranné či oboustranné čtení. Sekvenování Mi-Seq využívá fluorescenčně značených, reverzibilně terminovaných bází, kdy je každý nukleotid detekován při inkorporaci do vlákna nukleové kyseliny. Zároveň dochází k záznamu intenzity fluorescenčně značeného terminátoru. Nakonec je terminátor odštěpena a umožní inkorporaci další báze.

Obecný princip sekvenování pomocí Mi-Seq sekvenátoru:

1. na oba konce DNA fragmentů ligací připojeny dva adaptory,
2. denaturace DNA,
3. fragmenty DNA jedním koncem imobilizovány na destičku,
4. volný konec ssDNA hybridizuje s komplementárním adaptorem navázaným na povrchu destičky, vytváří můstek
5. můstková amplifikace (vznikají shluky tisíců kopií ssDNA) pro dostatečný světelný signál během sekvenování (obr. 7 a 8) (Ansorge, 2009)).



Obrázek 7 tzv. můstková amplifikace fragmentů DNA, (A) fragment DNA opatřený na obou koncích adaptory nanesen na destičku, (B) volný konec hybridizuje s navázaným oligonukleotidem, (C) isotermální amplifikace, (D) ke každému fragmentu DNA připojen sekvenční primer (před samotným sekvenováním (převzato z Ansorge, 2009))



Obrázek 8 (E) fluorescenčně značený nukleotid s navázaným reverzibilním terminátorem je inkorporován do řetězce, (F) odstraněna blokující skupina, pokračování syntézy až na konec řetězce, (G) eliminace vzniku chyb přirozenou kompeticí všech čtyř značených nukleotidů, (H) intenzita fluorescence detekována CCD kamerou (převzato z Ansorge, 2009).

## 4.5 Vyhodnocení sekvenačních dat z Mi-Seq analýzy

Získané ITS sekvence z Mi-Seq byly vyhodnoceny v programu SEED (Baldrian et al., 2013). Data byla koanalyzována s daty z odběru dřeva roku 2013. Pro čtení párů (2x250 bp) byla data sloučena pomocí fastqjoin. Sekvenací mezerníku ITS2 bylo získáno 4 791 538 sekvencí. Ze sekvencí byl vybrán úsek ITS2 o max. délce 396 bp a min. délce 40 bp. Byly vynechány sekvence dvojnásobnými bázemi a sekvence s průměrem kvality <30. Byly odstraněny sekvence kratší než 200 bp. Filtrované sekvence byly seskupeny pomocí algoritmu UPARSE implementovaného v USEARCH 7.0.1090 (Edgar, 2013) při 97% úrovni podobnosti. Pro každý klastr (operační taxonomickou jednotku, OTU) byla zkonstruována konsenzuální sekvence. Vzniklé konsenzuální sekvence byly seskupeny do finálních klastrů na základě 97% úrovni podobnosti, které přibližně odpovídají úrovni vzájemné podobnosti studovaných sekvencí na úrovni druhů hub (Tláškal, et al., 2016).

K identifikaci jednotlivých OTU byl použit algoritmus BLASTn proti databázi GenBank. Nebakteriální sekvence byly odstraněny. Pro každou operační taxonomickou jednotku byla nalezena nejpodobnější sekvence se známým taxonomickým zařazením minimálně na úrovni rodu („best hit“). Počty sekvencí jednotlivých OTU a jejich taxonomická identita byly použity jako vstup pro statistické vyhodnocení složení společenstva hub (Tláškal et al., 2016).

## 4.6 Vyhodnocení funkční struktury houbového společenstva

Po identifikaci jednotlivých houbových OTU, pro kterou byl použit algoritmus BLASTn proti databázi GenBank, byly OTU přiřazeny k ekofyziologickým kategoriím pomocí FUNGuild, <https://github.com/UMNFuN/FUNGuild> (Tedersoo et al., 2015). FUNGuild byl použit na rozřazení (při 97% úrovni podobnosti), jak houbových společenstev ze vzorků dřeva, tak z odebraných plodnic. Ekofyziologické kategorie byly rozdělené podle trofismu jednotlivých houbových zástupců a podle vlastností, zejména pak degradačních (př. již zmíněné houby bílé, hnědé a měkké hniloby). Jednotlivé kategorie byly následně statisticky zhodnoceny vzhledem k druhu stromu, věkové třídě a roku odběru.



## 4.7 Statistické zhodnocení výsledků

K vyhodnocení výsledků byly použity program *Past* a platforma R (balíček *vegan*). V těchto programech/platformách byly počítány významné statistické rozdíly mezi hodnotami aktivit enzymů, prvkového složení jak u plodnic, tak u vzorků dřeva z vybraných kmenů. Dále byly programy/platformy použity na vyhodnocení statistických rozdílů u a jednotlivých OTU (kmeny, řády a rody) ve vzorcích dřeva. Enzymové aktivity, prvkové složení a rozdíly mezi jednotlivými kmeny a řády byly analyzovány pomocí testů *ANOVA*, *Kruskal-Wallis* a *Fisher LSD post-hoc test*. Rozdíly v hodnotou  $p < 0,05$  byly považovány za signifikantní. Pro zpracování dat z Mi-seq sekvenování byl použit program *SEED*.

U vzorků plodnic byl použit program *Past* se zobrazením vzorků metodou *NMDS (Nonmetric MultiDimensional Scaling)* s *Bray-Curtisovým indexem*. Byly zjišťovány rozdíly mezi jednotlivými vzorky plodnic u prvkového složení a enzymatické aktivity. Výsledky byly zobrazeny pomocí grafů v programu *Past* a *Excel*. Plodnice byly porovnávány mezi sebou. Pro identifikaci plodnic byla použita Sangerova metoda. Výsledky byly zpracovány v programu *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

U vzorků dřeva byly použity programy *Past* a platforma R (balíček *vegan*). Byly zjišťovány rozdíly mezi jednotlivými druhy strom i mezi jednotlivými věkovými třídami v závislosti na době rozkladu. Programy byly použity na vyhodnocení statistických rozdílů u a jednotlivých OTU (kmeny, řády a rody) ve vzorcích dřeva. Pro zpracování dat z Mi-seq sekvenování byl použit program *SEED*. Enzymové aktivity, prvkové složení a rozdíly mezi jednotlivými kmeny a řády byly analyzovány pomocí testů *ANOVA*, *Kruskal-Wallis* a *Fisher LSD post-hoc test*. Rozdíly v hodnotou  $p < 0,05$  byly považovány za signifikantní. Výsledky byly zobrazeny pomocí grafů v programu *Past* a *Excel* a byly komentovány v příslušných podkapitolách ve výsledcích.

Pomocí programu *SEED* (Větrovský a Baldrian 2013) byly stanoveny indexy diverzity Chao1 index a Shannon-Wiener index, které reprezentují odhad diverzity houbového společenstva a počet dominantních OTU, které představují  $\geq 80$  % všech získaných sekvencí daného vzorku.

## 5 Výsledky

### 5.1 Plodnice hub

#### 5.1.1 Identifikace plodnic hub izolovaných z tlejících kmenů

V Žofinském pralese bylo celkem odebráno 60 plodnic dřevokazných hub rostoucích na vybraných sledovaných kmenech. Vzhledem k jejich velikosti a stavu jich bylo izolováno 47, celkem 22 z nich se podařilo převést do čistých kultur. Část DNA z těchto 60 plodnic hub byla odeslána na sekvenaci Sangerovou metodou do externí laboratoře. Úspěšně izolované kultury byly uloženy do CCBAS (*Culture Collection of Basidiomycetes*) s příslušným označením, část DNA (obr. 9 a 10) byla pro kontrolu čistoty izolátu a taxonomické identity znovu sekvenována. Seznam získaných plodnic a jejich identifikace je uvedena v tabulce 7.

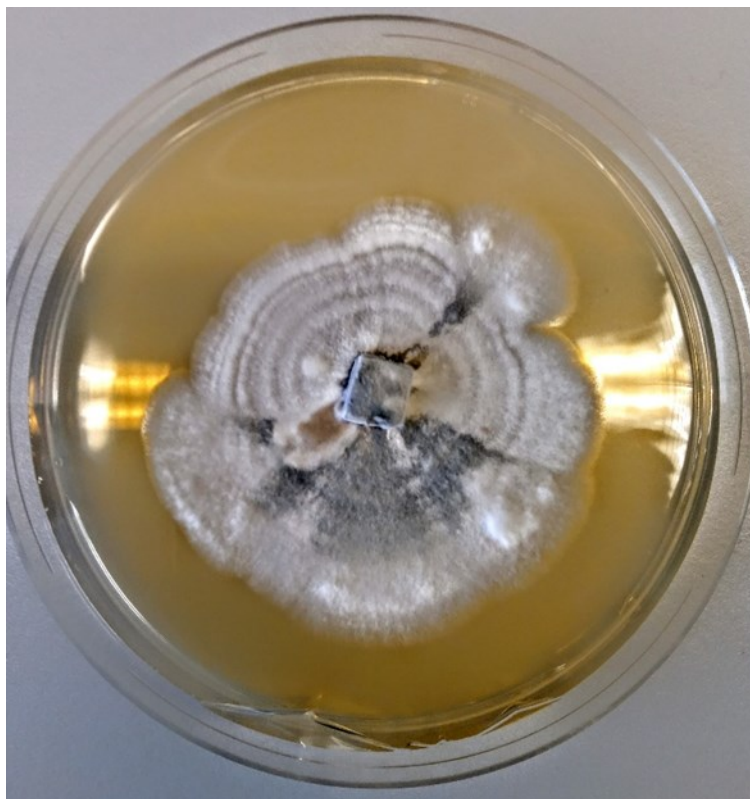
Sekvence mezerníku ITS2 amplifikované z primerů gITS7 (5'GTGAATCATCGAATCTTTG-3') a ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') byly použity pro identifikaci plodnic hub izolovaných z tlejících kmenů z odběru z roku 2017. Po odstranění nekvalitních sekvencí vznikl soubor o 20 538 sekvencích max. délky 350 bp a min. délky 63 bp. Sekvence byly zařazeny do 63 OTU na 97% úrovni podobnosti (odstranění singletonů, tj. OTU obsahujících pouze 1 sekvenci). Pro jednotlivé OTU byla určena E-hodnota, podobnost s nalezenou sekvencí a délka alingmentu.

číslo OTU	označení	best hit	E-hodnota	podobnost [%]	pokrytí [%]	plodnice	izolát	sekvence genomu	C/N poměr	P	pH
Z01_	MK028464	<i>Mycena cf. galericulata</i>	1.43816e-108	100	100	X					
Z02_	MK028392	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	3.07036e-055	87	99	X					
Z03_	EF643580.1	<i>Dipodascus australiensis strain A401</i>	4.34987E-102	89	46	X		X	X	X	X
Z04_	LC492856	<i>Mycena haematopus</i>	2.99959e-100	99	100	X					
Z05_	MN597451	<i>Pluteus insidiosus</i>	1.7135e-097	100	100	X					
Z06_	MK028497	<i>Pluteus phlebophorus</i>	1.6829e-097	100	100	X					
Z07_	JF908610.1	<i>Pluteus galeroides</i>	0	91	99	X				X	
Z08_	JX504150	<i>Laccaria amethystina</i>	6.30151e-102	100	100	X		X			
Z09_	MT035958	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	1.03008e-099	100	100	X			X	X	X
Z10_	MK028392	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	2.88097e-100	100	100	X					
Z11_	JF908421.1	<i>Mycena romagnesiana</i>	0	98	100	X					
Z12_	MK415313	<i>Ganoderma applanatum</i>	9.82151e-095	100	100	X			X	X	X
Z13_	MK404402	<i>Hypholoma fasciculare</i>	6.41078e-102	100	100	X					
Z15_	MN959786	<i>Lactarius subdulcis</i>	6.34985e-138	100	100	X		X			
Z16_	JX536159	<i>Gymnopus dryophilus</i>	0	100	100	X					
Z17_	MN959786	<i>Lactarius subdulcis</i>	6.34985e-138	100	100	X			X		
Z18_	MN947342	<i>Laccaria amethystina</i>	6.30151e-102	100	100	X					
Z19_	MF437013	<i>Tyromyces kmetii</i>	1.6829e-097	100	100	X	X	X			
Z20_	KX533920	<i>Polyporus varius</i>	2.79902e-095	100	100	X					
Z21_	JN241552.1	<i>Athelia rolfsii isolate 3087</i>	4.80275E-32	81	25	X					
Z22_	MK120542	<i>Fomitopsis pinicola</i>	2.15446e-086	99	100	X	X	X	X	X	X
Z23_	MH855142	<i>Kretzschmaria deusta</i>	5.13344e-082	100	100	X			X		
Z24_	MK415313	<i>Ganoderma applanatum</i>	9.82151e-095	100	100	X		X	X	X	X
Z25_	MH856155	<i>Mycetinis alliaceus</i>	1.93262e-153	100	100	X					
Z26_	FJ865440.1	<i>Fomes fomentarius isolate 7</i>	0	89	99	X	X	X	X	X	X
Z27_	LT838193	<i>Pluteus cervinus</i>	9.33486e-090	100	100	X		X	X	X	
Z28_	MK184459	<i>Fomes fomentarius</i>	5.83714e-092	100	100	X				X	X
Z29_	HM562155.1	<i>Pluteus cervinus voucher REG 13616</i>	5.06038E-176	95	60	X			X	X	
Z30_	MK028455	<i>Lycoperdon cf. pyriforme</i>	6.30151e-102	100	100	X					
Z31_	LT838193	<i>Pluteus cervinus</i>	4.37185e-088	100	100	X					
Z32_	AF498289.1	<i>Megacollybia platyphylla</i>	0	88	98	X	X	X	X	X	
Z33_	MK214416	<i>Hypholoma lateritium</i>	3.85287e-104	100	100	X	X	X	X	X	
iz34	MK415313	<i>Ganoderma applanatum</i>	4.56951e-093	100	100	X	X		X	X	
Z35_	LT838193	<i>Pluteus cervinus</i>	4.37185e-088	100	100	X					
Z36_	MK120542	<i>Fomitopsis pinicola</i>	1.6829e-097	100	100	X			X	X	
Z37_	JF908397.1	<i>Mycena laevigata voucher 227d</i>	0	84	99	X	X	X			
Z38_	MK028392	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	6.23619e-097	99	100	X					
Z39_	MH855142	<i>Kretzschmaria deusta</i>	5.13344e-082	100	100	X	X	X	X	X	
Z40_	MN597451	<i>Pluteus insidiosus</i>	4.79252e-098	100	100	X					
Z41_	JF908394.1	<i>Mycena amicta voucher 189f</i>	0	92	99	X					
Z42_	JF908460	<i>Mycena epipterygia</i>	3.91817e-104	100	100	X					
Z43_	MG654742	<i>Mycena purpureofusca</i>	5.13281e-098	98	100	X					
Z44_	JF908395	<i>Mycena speirea</i>	1.28637e-093	100	100	X					
Z45_	MK028477	<i>Mycena sp. strain Montri-271</i>	1.92699e-082	94	100	X					
Z46_	AY909025.1	<i>Hypoxylon cohaerens strain F-160,842</i>	1.12682E-152	86	78	X					
Z47_	DQ112630.1	<i>Lycoperdon perlatum</i>	4.01528E-95	92	99	X		X	X	X	
Z51_	MK028403	<i>Galerina cf. marginata</i>	3.0121e-105	100	100	X					
Z52_	MH856703	<i>Sarcomyxa serotina</i>	1.37791e-103	100	100	X			X	X	
Z53_	EU153471	<i>Trametes versicolor strain DSM11269</i>	6.00468e-072	93	100	X			X	X	X
Z54_	MK120542	<i>Fomitopsis pinicola</i>	1.6829e-097	100	100	X			X	X	X
Z55_	MK509800	<i>Trametes versicolor</i>	1.25461e-093	100	100	X					
Z56_	MG915102	<i>Fungal sp.</i>	4.74086e-093	99	100	X			X	X	
Z57_	MK509800	<i>Trametes versicolor</i>	1.25461e-093	100	100	X	X	X	X	X	X
Z58_	MK509800	<i>Trametes versicolor</i>	1.25461e-093	100	100	X			X	X	X
Z59_	MN663268	<i>Scleroderma citrinum</i>	9.5712e-121	100	100	X			X	X	
Z60_	MK028453	<i>Lycoperdon cf. perlatum</i>	2.35451e-106	100	100	X					
Z61_	MK184459	<i>Fomes fomentarius</i>	5.83714e-092	100	100	X			X	X	
Z62_	MK415313	<i>Ganoderma applanatum</i>	9.82151e-095	100	100	X			X	X	X
Z63_	MK415313	<i>Ganoderma applanatum</i>	9.82151e-095	100	100	X			X	X	

Tabulka 7 Seznam získaných plodnic a jejich identifikace (E-hodnota, podobnost s nalezenou sekvencí a délka alingment, získané plodnice a izoláty a C/N poměr, P a pH).



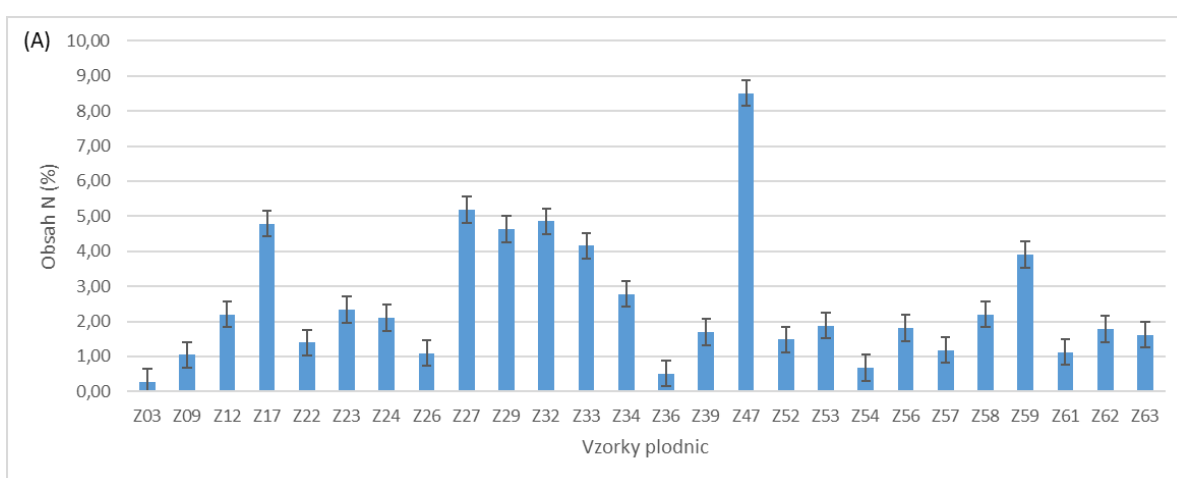
Obrázek 9 Příklad houby bílé hniloby: *Hypholoma lateritium* (třepenitka cihlová), vzorek Z33, ME medium.



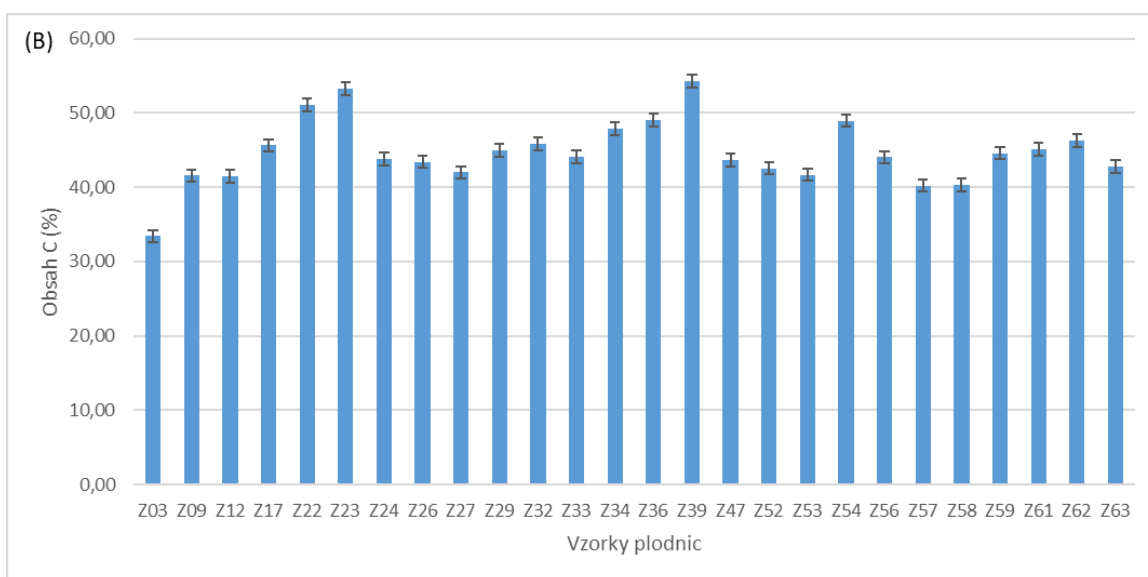
Obrázek 10 Příklad houby měkké hniloby: *Kretzchmaria deusta* syn. *Hypoxyylon deustum* syn. *Ustulina deusta* (spálenka skořepatá), vzorek Z23, ME medium.

### 5.1.2 Analýza prvkového složení

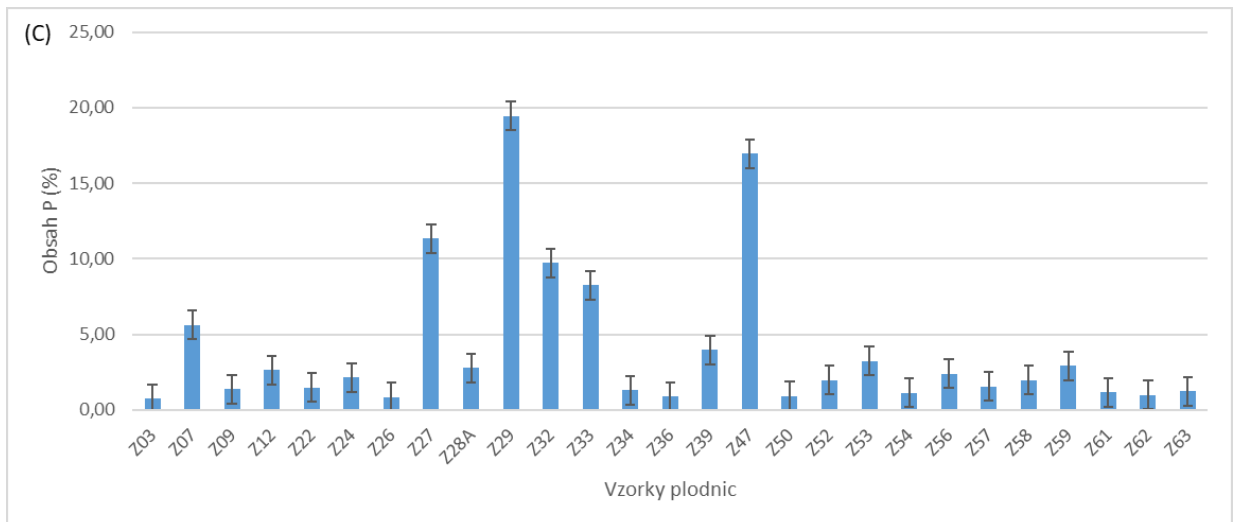
Analýzou prvkového složení byly zjišťovány obsahy uhlíku, dusíku, fosforu a stanovení pH v plodnicích hub sesbíraných na vytipovaných tlejících kmenech. Měření obsahu uhlíku, dusíku, fosforu a pH bylo provedeno u 28 plodnic hub (tabulka 7, grafy 1, 2, 3). U zbylých plodnic nebylo dostatečné množství pro navážení příslušných hmotností. Prvkové složení plodnic hub je druhově specifické. Zejména v obsahu dusíku, fosforu a vypočteného C/N poměru lze sledovat občasná rozdíly. Hodnoty pro obsah C se pohybují v rozmezí od 33,42 do 54,21 %, u N v rozmezí od 0,28 do 8,51 %, a u P v rozmezí od 0,75 do 19,44%.



Graf 1 Naměřené hodnoty N (graf A) v odebraných plodnicích. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech vztahené na g sušiny a se střední chybou průměru.

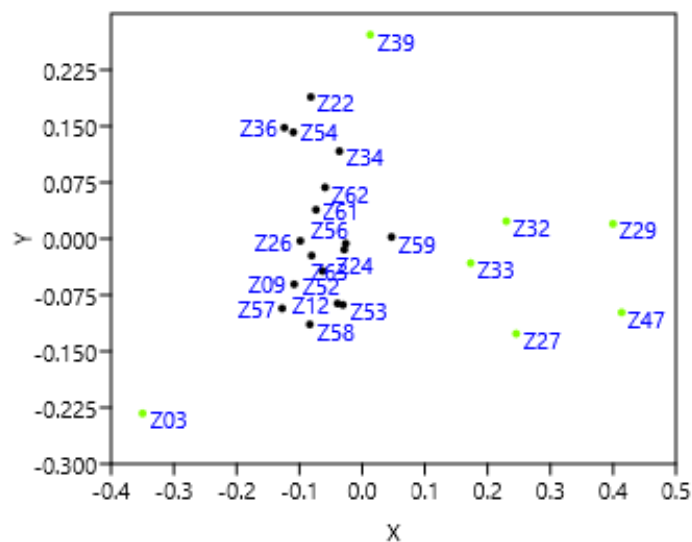


Graf 2 Naměřené hodnoty C (graf B) v odebraných plodnicích. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech vztahené na g sušiny a se střední chybou průměru.



Graf 3 Naměřené hodnoty P (graf C) v odebraných plodnicích. Hodnoty jsou uvedeny v hmotnostních procentech vztahované na g sušiny a se střední chybou průměru.

Kromě vzorku Z47 (*Lycopedron perlatum*), který vykazoval zvýšené množství dusíku a fosforu a vzorku Z29 (*Pluteus cervinus*, zvýšené množství fosforu), nejsou viditelné výrazné rozdíly. U naměřených obsahů jednotlivých prvků nebyla zjištěna korelace pomocí *Spearmanovy korelační metody* (-0.02). Na grafu 4 jsou zeleně znázorněny plodnice s výrazně odlišným prvkovým složením (jedná se o vyšší nebo výrazně nižší hodnoty fosforu). Pouze u vzorku Z03 (*Dipodascus australiensis*) šlo o nižší hodnoty fosforu, u ostatních: Z27 (*Pluteus cervinus*), Z29 (*Pluteus cervinus*), Z32 (*Megacollybia platyphylla*), Z33 (*Hypholoma lateritium*), Z39 (*Kretzschmaria deusta*) a Z47 (*Lycopedron perlatum*), byly hodnoty vyšší.



Graf 4 NMDS metoda (program Past) naměřených hodnot dusíku, uhlíku a fosforu u vzorků odebraných plodnic. K výpočtu byl použit Bray-Curtisův index ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.3 Enzymová aktivita

U plodnic hub byla stanovována enzymatická aktivita 1,4- $\beta$ -glukosidázy, fosfatázy, chitinázy, celobiohydrolázy, 1,4- $\alpha$ -glukosidázy, 1,4- $\beta$ -xylosidázy, 1,4- $\beta$ -manosidázy, 1,4- $\beta$ -galaktosidázy, lipázy,  $\beta$ -D-glukuronidázy, 1,4- $\alpha$ -galaktosidázy, endo-1,4- $\beta$ -glukanázy, endo-1,4- $\beta$ -xylanázy, lakázy, manganová peroxidázy, oxidázy, peroxidázy, proteázy (tabulka 8-10).

Zvolené spektrum enzymů reflektovalo mikrobiální způsob rozkladu dřevní hmoty v přirozeném prostředí. V naměřených enzymových aktivitách nebyly pozorovány mezi plodnicemi velmi výrazné rozdíly. Vyčlenění některých skupin plodnic (zeleně označené) patrných v *non-metric NMDS* jsou způsobeny nižšími hodnotami aktivit enzymů celkově (graf 5). Podle metody jsou viditelné rozdíly v enzymatické aktivitě u vzorků Z07 (*Pluteus galeroideus*), Z17 (*Lactarius subdulcis*), Z59 (*Scleroderma citrinum*), Z39 (*Kretzschmaria deusta*) a Z36 (*Fomitopsis pinicola*).

(A)

kód	jméno plodnice	1,4- $\beta$ - glukozidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	fosfatáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	celobiohydroláza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,4- $\beta$ - xylozidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,4- $\beta$ - manozidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	chitináza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	endo-1,4- $\beta$ - glukanáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )
Z01	<i>Mycena galericulata</i>	22,6 ± 0,8	33,9 ± 1,0	11,2 ± 0,5	5,2 ± 0,2	0,3 ± 0,0	3,7 ± 0,4	10,4 ± 0,2
Z02	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	11,0 ± 0,4	28,7 ± 0,3	4,1 ± 0,5	0,9 ± 0,0	7,8 ± 0,1	12,7 ± 0,9	16,8 ± 3,4
Z03	<i>Dipodascus australiensis</i>	19,6 ± 0,7	3,1 ± 0,4	19,9 ± 1,2	16,5 ± 0,3	2,9 ± 0,2	6,9 ± 0,2	27,7 ± 16,6
Z07	<i>Pluteus galeroideus</i>	12,4 ± 6,3	23,1 ± 1,0	10,0 ± 1,0	1,6 ± 0,3	0,3 ± 0,0	2,4 ± 0,5	44,2 ± 19,5
Z09	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	17,8 ± 0,4	16,9 ± 0,1	14,2 ± 0,2	1,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	7,0 ± 0,1	12,2 ± 7,3
Z10	<i>Crepidotus applanatus</i>	15,0 ± 0,7	16,4 ± 0,6	10,5 ± 0,2	1,7 ± 0,0	19,4 ± 0,8	6,5 ± 0,2	10,2 ± 0,1
Z12	<i>Ganoderma applanatum</i>	16,3 ± 0,4	11,3 ± 0,3	10,9 ± 0,5	3,0 ± 0,4	0,6 ± 0,1	5,1 ± 0,2	24,3 ± 6,4
Z13	<i>Hypholoma fasciculare</i>	11,1 ± 1,3	11,5 ± 2,9	7,8 ± 1,3	3,6 ± 0,6	0,1 ± 0,0	12,9 ± 0,7	11,4 ± 6,9
Z14	<i>Mycena romagnesiana</i>	20,9 ± 2,9	20,9 ± 0,8	14,9 ± 0,3	6,8 ± 0,1	1,5 ± 0,0	5,6 ± 0,1	20,5 ± 10,6
Z15	<i>Lactarius subdulcis</i>	26,1 ± 2,3	2,8 ± 1,8	30,7 ± 0,5	9,7 ± 0,6	4,0 ± 0,1	7,7 ± 0,3	22,2 ± 4,3
Z16	<i>Gymnopus dryophilus</i>	13,8 ± 0,3	7,4 ± 0,2	9,8 ± 0,7	3,0 ± 0,2	7,4 ± 0,3	6,6 ± 0,1	15,6 ± 1,7
Z17	<i>Lactarius subdulcis</i>	14,6 ± 0,6	3,1 ± 0,9	15,8 ± 0,5	4,8 ± 0,3	4,1 ± 0,5	4,8 ± 0,5	39,0 ± 13,9
Z18	<i>Laccaria amethystina</i>	16,2 ± 0,1	30,3 ± 0,3	10,5 ± 0,7	3,2 ± 0,2	0,8 ± 0,0	2,4 ± 0,0	24,3 ± 2,1
Z19	<i>Tyromyces kmetii</i>	15,1 ± 0,3	17,2 ± 0,0	8,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	4,7 ± 0,2	8,7 ± 0,0	1,8 ± 1,1
Z20	<i>Polyporus varius</i>	16,8 ± 3,9	18,4 ± 1,0	11,6 ± 0,4	4,7 ± 0,2	1,5 ± 0,0	4,1 ± 0,1	24,4 ± 10,9
Z21	<i>Athelia rolfsii</i>	15,1 ± 0,2	16,3 ± 0,1	13,6 ± 0,7	4,0 ± 0,3	16,4 ± 0,4	6,5 ± 0,1	22,9 ± 0,6
Z22	<i>Fomitopsis pinicola</i>	8,6 ± 0,5	4,4 ± 1,0	0,5 ± 0,1	3,4 ± 0,3	7,0 ± 0,2	7,7 ± 0,5	1,9 ± 1,0
Z23	<i>Kretzschmaria deusta</i>	17,0 ± 0,7	17,6 ± 2,0	9,0 ± 0,8	1,8 ± 0,2	11,1 ± 0,4	6,5 ± 0,2	35,2 ± 10,2
Z24	<i>Ganoderma applanatum</i>	16,2 ± 0,4	19,1 ± 1,0	7,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,1 ± 0,0	2,8 ± 0,1	14,5 ± 0,5
Z25	<i>Marasmius alliaceus</i>	13,5 ± 0,2	5,7 ± 0,2	16,2 ± 0,8	4,6 ± 0,2	7,3 ± 0,2	6,4 ± 0,3	8,0 ± 0,5
Z26	<i>Fomes fomentarius</i>	13,2 ± 0,3	21,2 ± 1,0	7,3 ± 1,4	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	34,2 ± 14,6
Z27	<i>Pluteus cervinus</i>	14,2 ± 0,5	14,2 ± 0,4	14,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2	15,5 ± 0,5	6,5 ± 0,1	10,2 ± 1,4
Z28	<i>Fomes fomentarius</i>	15,8 ± 1,3	12,0 ± 0,4	8,9 ± 0,8	1,8 ± 0,1	10,7 ± 0,9	4,4 ± 0,4	15,7 ± 1,4
Z29	<i>Pluteus cervinus</i>	14,9 ± 0,3	17,0 ± 0,2	11,3 ± 0,5	2,6 ± 0,2	17,3 ± 0,3	6,5 ± 0,2	24,4 ± 7,2
Z30	<i>Lycoperdon cf. pyriforme</i>	16,3 ± 3,8	18,7 ± 5,8	16,7 ± 1,5	7,5 ± 1,6	2,3 ± 0,3	7,1 ± 0,6	16,1 ± 1,0
Z31	<i>Pluteus cervinus</i>	14,3 ± 1,1	12,6 ± 1,3	13,2 ± 0,4	2,8 ± 0,1	13,3 ± 1,0	4,4 ± 0,6	12,1 ± 3,6
Z32	<i>Megacollybia platyphylla</i>	15,3 ± 1,0	21,1 ± 0,7	10,4 ± 0,8	2,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	8,6 ± 0,2	34,9 ± 14,1
Z33	<i>Hypholoma sublateralitium</i>	16,1 ± 1,0	13,0 ± 2,0	16,8 ± 1,4	11,8 ± 0,7	0,5 ± 0,0	7,7 ± 0,7	19,8 ± 1,5
Z34	<i>Mycena romagnesiana</i>	19,2 ± 0,5	17,6 ± 0,1	16,0 ± 0,1	6,9 ± 0,1	1,9 ± 0,0	4,7 ± 0,0	23,2 ± 1,1
Z35	<i>Pluteus cervinus</i>	16,6 ± 0,9	9,4 ± 0,2	12,6 ± 0,0	2,7 ± 0,1	14,1 ± 0,1	5,6 ± 0,1	34,1 ± 1,1
Z36	<i>Fomitopsis pinicola</i>	12,6 ± 0,4	32,0 ± 3,6	0,9 ± 0,2	2,5 ± 0,4	2,7 ± 0,2	5,9 ± 0,5	32,6 ± 2,5
Z37	<i>Mycena laevigata</i>	16,1 ± 0,3	17,4 ± 0,7	13,5 ± 0,9	7,1 ± 0,4	1,1 ± 0,0	7,8 ± 0,1	42,1 ± 14,2
Z38	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	14,4 ± 1,1	24,1 ± 0,6	12,1 ± 0,9	2,5 ± 0,2	21,3 ± 0,3	12,5 ± 0,7	30,7 ± 4,0
Z39	<i>Kretzschmaria deusta</i>	17,7 ± 0,8	9,0 ± 0,1	6,3 ± 0,8	2,6 ± 0,3	9,2 ± 1,0	11,2 ± 0,7	31,0 ± 0,3
Z46	<i>Hypoxylon cohaerens</i>	14,0 ± 0,5	15,8 ± 0,1	4,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	3,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	13,7 ± 4,3
Z47	<i>Lycoperdon perlatum</i>	11,7 ± 1,3	5,2 ± 0,7	14,1 ± 0,4	7,7 ± 0,1	11,3 ± 0,8	4,1 ± 0,1	9,8 ± 3,1
Z50	<i>Lycoperdon perlatum</i>	7,8 ± 0,2	28,8 ± 0,6	1,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	13,0 ± 0,4	29,0 ± 4,2
Z51	<i>Galerina cf. marginata</i>	15,3 ± 0,4	9,2 ± 0,5	12,7 ± 1,3	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0	9,8 ± 0,2	43,8 ± 11,7
Z52	<i>Sarcomyxa serotina</i>	15,3 ± 0,0	13,1 ± 0,7	11,0 ± 0,2	3,5 ± 0,2	4,6 ± 0,5	8,0 ± 0,2	15,6 ± 1,7
Z53	<i>Trametes versicolor</i>	15,6 ± 0,1	10,7 ± 0,3	10,1 ± 0,2	1,1 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	25,2 ± 7,4
Z54	<i>Fomitopsis pinicola</i>	12,5 ± 0,9	23,5 ± 1,6	0,6 ± 0,2	1,9 ± 0,3	4,9 ± 0,4	6,9 ± 0,6	11,3 ± 0,2
Z55	<i>Trametes versicolor</i>	12,4 ± 0,2	12,9 ± 0,5	9,9 ± 0,8	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1	6,8 ± 0,5	19,8 ± 9,3
Z56	<i>Fungal sp.</i>	8,4 ± 0,2	2,7 ± 1,1	8,7 ± 0,8	14,6 ± 0,8	0,1 ± 0,0	3,3 ± 0,0	16,5 ± 1,5
Z57	<i>Trametes versicolor</i>	9,9 ± 0,2	8,3 ± 0,3	9,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	4,1 ± 0,1	16,5 ± 1,6
Z58	<i>Trametes versicolor</i>	15,1 ± 0,2	10,1 ± 0,2	13,6 ± 0,3	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,0	2,9 ± 0,3	47,2 ± 23,3
Z59	<i>Scleroderma citrinum</i>	6,4 ± 0,8	3,6 ± 3,6	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,3 ± 1,7	19,7 ± 0,4
Z60	<i>Lycoperdon cf. perlatum</i>	20,1 ± 0,6	6,6 ± 0,3	13,5 ± 0,3	5,2 ± 0,1	11,5 ± 0,1	2,0 ± 0,7	14,2 ± 4,0
Z61	<i>Fomes fomentarius</i>	13,9 ± 0,4	23,9 ± 0,7	7,2 ± 0,6	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0	9,3 ± 0,3	16,5 ± 1,9
Z62	<i>Ganoderma applanatum</i>	15,6 ± 0,1	16,0 ± 0,3	9,2 ± 1,1	1,7 ± 0,2	0,1 ± 0,0	3,1 ± 0,2	47,0 ± 12,2
Z63	<i>Ganoderma applanatum</i>	17,4 ± 0,8	16,1 ± 1,3	11,4 ± 0,6	1,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	2,6 ± 0,1	15,3 ± 1,0

Tabulka 8 Aktivity enzymů u jednotlivých vzorků plodnic. Hodnoty jsou vztažené na g sušiny. V tabulkách (A, B, C) jsou zahrnuty průměry jednotlivých měření a střední chyby průměru.



(B)

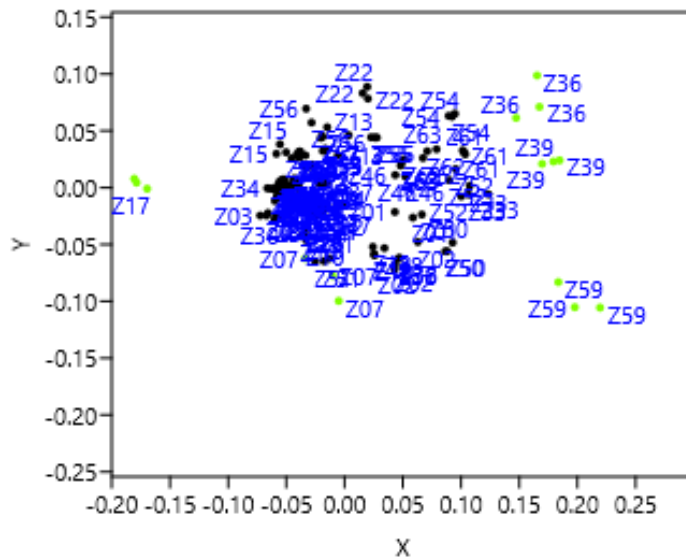
kód	jméno plodnice	endo-1,4- $\beta$ -xylanáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	$\beta$ -D-glukuronidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,4- $\alpha$ -galaktosidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	endo-1,4- $\beta$ -glukanáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	endo-1,4- $\beta$ -xylanáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,4- $\alpha$ -glukozidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	1,4- $\beta$ -galaktosidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )
Z01	<i>Mycena galericulata</i>	8,4 ± 1,8	3,0 ± 0,2	13,8 ± 0,9	10,4 ± 0,2	8,4 ± 1,8	2,2 ± 0,0	3,1 ± 0,1
Z02	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	12,7 ± 3,5	0,5 ± 0,0	3,0 ± 0,4	16,8 ± 3,4	12,7 ± 3,5	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,0
Z03	<i>Dipodascus australiensis</i>	13,3 ± 1,5	0,3 ± 0,0	3,8 ± 0,1	27,7 ± 16,6	13,3 ± 1,5	0,7 ± 0,0	7,2 ± 2,0
Z07	<i>Pluteus galerooides</i>	20,5 ± 5,5	0,1 ± 0,0	3,4 ± 0,3	44,2 ± 19,5	20,5 ± 5,5	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Z09	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	10,4 ± 3,9	0,6 ± 0,0	20,9 ± 0,3	12,2 ± 7,3	10,4 ± 3,9	6,7 ± 0,4	4,3 ± 0,1
Z10	<i>Crepidotus applanatus</i>	60,9 ± 44,5	0,4 ± 0,0	2,7 ± 0,1	10,2 ± 0,1	60,9 ± 44,5	2,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Z12	<i>Ganoderma applanatum</i>	10,2 ± 4,2	2,2 ± 0,3	14,0 ± 0,3	24,3 ± 6,4	10,2 ± 4,2	12,9 ± 0,5	9,2 ± 0,1
Z13	<i>Hypholoma fasciculare</i>	17,9 ± 15,3	0,6 ± 0,1	27,9 ± 0,8	11,4 ± 6,9	17,9 ± 15,3	4,2 ± 0,5	4,9 ± 0,1
Z14	<i>Mycena romagnesiana</i>	31,1 ± 19,1	0,4 ± 0,0	9,9 ± 0,3	20,5 ± 10,6	31,1 ± 19,1	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1
Z15	<i>Lactarius subdulcis</i>	29,4 ± 15,4	0,1 ± 0,0	3,0 ± 0,6	22,2 ± 4,3	29,4 ± 15,4	3,5 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Z16	<i>Gymnopus dryophilus</i>	12,6 ± 1,3	5,6 ± 0,2	18,8 ± 0,9	15,6 ± 1,7	12,6 ± 1,3	4,0 ± 0,1	0,9 ± 0,0
Z17	<i>Lactarius subdulcis</i>	26,0 ± 9,5	0,1 ± 0,0	2,1 ± 0,1	39,0 ± 13,9	26,0 ± 9,5	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,0
Z18	<i>Laccaria amethystina</i>	25,8 ± 2,5	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,1	24,3 ± 2,1	25,8 ± 2,5	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Z19	<i>Tyromyces kmetii</i>	2,9 ± 1,4	1,1 ± 0,0	13,9 ± 2,1	1,8 ± 1,1	2,9 ± 1,4	4,7 ± 0,2	5,5 ± 0,1
Z20	<i>Polyporus varius</i>	20,9 ± 3,7	0,5 ± 0,0	16,4 ± 0,7	24,4 ± 10,9	20,9 ± 3,7	1,2 ± 0,0	5,9 ± 0,1
Z21	<i>Athelia rolfsii</i>	14,6 ± 2,3	0,1 ± 0,0	5,0 ± 0,2	22,9 ± 0,6	14,6 ± 2,3	0,6 ± 0,0	3,0 ± 0,1
Z22	<i>Fomitopsis pinicola</i>	3,0 ± 1,7	1,8 ± 0,0	35,1 ± 0,5	1,9 ± 1,0	3,0 ± 1,7	8,1 ± 0,3	15,5 ± 0,4
Z23	<i>Kretzschmaria deusta</i>	16,8 ± 5,4	1,5 ± 0,1	8,2 ± 0,8	35,2 ± 10,2	16,8 ± 5,4	5,2 ± 0,1	0,4 ± 0,0
Z24	<i>Ganoderma applanatum</i>	59,9 ± 25,6	0,9 ± 0,1	11,1 ± 0,6	14,5 ± 0,5	59,9 ± 25,6	9,7 ± 0,2	11,2 ± 0,1
Z25	<i>Marasmius alliaceus</i>	4,4 ± 1,3	2,0 ± 0,0	18,9 ± 0,8	8,0 ± 0,5	4,4 ± 1,3	4,4 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Z26	<i>Fomes fomentarius</i>	21,8 ± 1,4	0,4 ± 0,1	19,0 ± 0,6	34,2 ± 14,6	21,8 ± 1,4	2,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Z27	<i>Pluteus cervinus</i>	7,5 ± 0,9	0,2 ± 0,0	9,1 ± 0,1	10,2 ± 1,4	7,5 ± 0,9	1,1 ± 0,3	5,2 ± 0,3
Z28	<i>Fomes fomentarius</i>	7,0 ± 3,2	1,3 ± 0,0	15,8 ± 1,6	15,7 ± 1,4	7,0 ± 3,2	5,1 ± 0,5	11,4 ± 1,1
Z29	<i>Pluteus cervinus</i>	29,6 ± 17,6	0,1 ± 0,0	10,3 ± 0,5	24,4 ± 7,2	29,6 ± 17,6	1,3 ± 0,1	5,8 ± 0,3
Z30	<i>Lycoperdon cf. pyriforme</i>	15,4 ± 2,7	0,4 ± 0,0	6,6 ± 0,6	16,1 ± 1,0	15,4 ± 2,7	3,3 ± 0,3	1,9 ± 0,4
Z31	<i>Pluteus cervinus</i>	34,8 ± 18,2	0,0 ± 0,0	17,1 ± 0,4	12,1 ± 3,6	34,8 ± 18,2	1,2 ± 0,0	9,5 ± 0,2
Z32	<i>Megacollybia platyphylla</i>	42,0 ± 16,7	0,8 ± 0,0	8,5 ± 0,5	34,9 ± 14,1	42,0 ± 16,7	5,1 ± 0,3	1,3 ± 0,1
Z33	<i>Hypholoma sublateritium</i>	48,8 ± 18,8	0,9 ± 0,1	3,1 ± 0,4	19,8 ± 1,5	48,8 ± 18,8	1,0 ± 0,3	3,3 ± 0,3
Z34	<i>Mycena romagnesiana</i>	23,1 ± 2,3	0,2 ± 0,0	9,7 ± 0,0	23,2 ± 1,1	23,1 ± 2,3	2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,0
Z35	<i>Pluteus cervinus</i>	19,8 ± 2,0	0,2 ± 0,0	12,4 ± 0,1	34,1 ± 1,1	19,8 ± 2,0	3,9 ± 0,1	6,4 ± 0,2
Z36	<i>Fomitopsis pinicola</i>	22,9 ± 1,3	0,5 ± 0,0	13,7 ± 1,0	32,6 ± 2,5	22,9 ± 1,3	2,1 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Z37	<i>Mycena laevigata</i>	41,6 ± 20,9	3,1 ± 0,1	6,7 ± 0,5	42,1 ± 14,2	41,6 ± 20,9	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Z38	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	27,2 ± 6,7	0,5 ± 0,0	4,9 ± 0,2	30,7 ± 4,0	27,2 ± 6,7	2,7 ± 0,2	0,4 ± 0,0
Z39	<i>Kretzschmaria deusta</i>	29,3 ± 9,8	0,9 ± 0,0	9,3 ± 0,3	31,0 ± 0,3	29,3 ± 9,8	2,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Z46	<i>Hypoxyylon cohaerens</i>	38,8 ± 18,8	0,2 ± 0,0	1,8 ± 0,1	13,7 ± 4,3	38,8 ± 18,8	9,0 ± 0,1	21,0 ± 0,2
Z47	<i>Lycoperdon perlatum</i>	27,7 ± 11,3	1,9 ± 0,0	13,8 ± 0,7	9,8 ± 3,1	27,7 ± 11,3	10,8 ± 0,2	7,3 ± 0,1
Z50	<i>Lycoperdon perlatum</i>	25,0 ± 8,8	0,1 ± 0,0	3,8 ± 0,1	29,0 ± 4,2	25,0 ± 8,8	2,9 ± 0,3	3,8 ± 0,2
Z51	<i>Galerina cf. marginata</i>	30,4 ± 5,2	0,2 ± 0,0	2,9 ± 0,6	43,8 ± 11,7	30,4 ± 5,2	0,8 ± 0,0	2,6 ± 0,1
Z52	<i>Sarcomyxa serotina</i>	29,4 ± 17,7	0,5 ± 0,0	3,0 ± 0,2	15,6 ± 1,7	29,4 ± 17,7	0,3 ± 0,0	7,7 ± 0,4
Z53	<i>Trametes versicolor</i>	11,2 ± 5,5	1,1 ± 0,1	16,9 ± 0,2	25,2 ± 7,4	11,2 ± 5,5	14,1 ± 0,2	10,4 ± 0,1
Z54	<i>Fomitopsis pinicola</i>	10,7 ± 1,5	0,6 ± 0,0	31,7 ± 0,8	11,3 ± 0,2	10,7 ± 1,5	4,1 ± 0,1	6,4 ± 0,1
Z55	<i>Trametes versicolor</i>	8,3 ± 0,5	0,9 ± 0,1	16,1 ± 0,3	19,8 ± 9,3	8,3 ± 0,5	11,8 ± 0,2	9,0 ± 0,1
Z56	<i>Fungal sp.</i>	36,1 ± 18,7	19,1 ± 2,8	19,3 ± 1,9	16,5 ± 1,5	36,1 ± 18,7	1,8 ± 0,1	9,6 ± 0,4
Z57	<i>Trametes versicolor</i>	15,0 ± 2,4	8,9 ± 0,2	14,8 ± 0,2	16,5 ± 1,6	15,0 ± 2,4	13,4 ± 0,2	8,8 ± 0,1
Z58	<i>Trametes versicolor</i>	34,3 ± 20,6	1,7 ± 0,4	11,3 ± 0,6	47,2 ± 23,3	34,3 ± 20,6	15,0 ± 0,6	11,8 ± 0,4
Z59	<i>Scleroderma citrinum</i>	35,4 ± 16,2	2,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0	19,7 ± 0,4	35,4 ± 16,2	0,4 ± 0,1	13,7 ± 0,4
Z60	<i>Lycoperdon cf. perlatum</i>	5,4 ± 2,7	0,7 ± 0,0	13,6 ± 0,2	14,2 ± 4,0	5,4 ± 2,7	2,0 ± 0,1	11,6 ± 0,4
Z61	<i>Fomes fomentarius</i>	37,0 ± 21,4	0,6 ± 0,0	15,6 ± 0,3	16,5 ± 1,9	37,0 ± 21,4	4,2 ± 0,2	7,5 ± 0,5
Z62	<i>Ganoderma applanatum</i>	25,5 ± 2,4	0,8 ± 0,2	18,4 ± 0,9	47,0 ± 12,2	25,5 ± 2,4	6,3 ± 0,7	5,5 ± 0,1
Z63	<i>Ganoderma applanatum</i>	11,3 ± 1,0	1,1 ± 0,0	18,4 ± 0,3	15,3 ± 1,0	11,3 ± 1,0	3,9 ± 0,1	6,7 ± 0,1

Tabulka 9 Aktivity enzymů u jednotlivých vzorků plodnic. Hodnoty jsou vztaženy na g sušiny. V tabulkách (A, B, C) jsou zahrnuty průměry jednotlivých měření a střední chyby průměru.

(c)

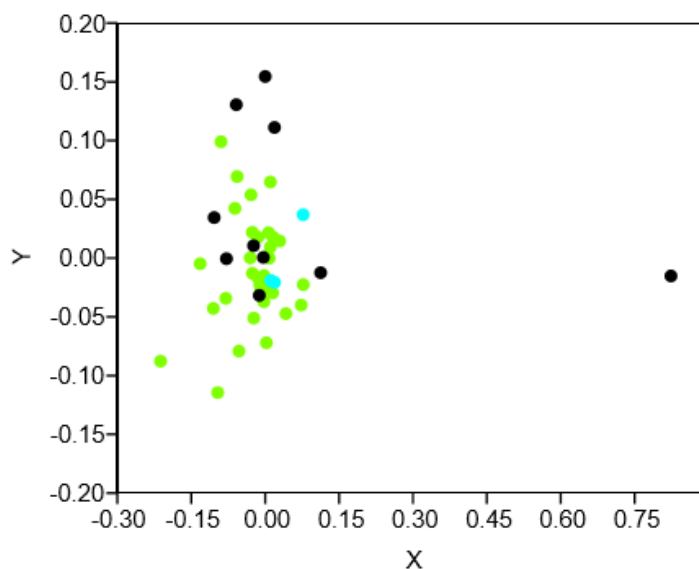
kód	jméno plodnice	lipáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	endo-1,4-β-glukanáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	endo-1,4-β-xylanáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	lakáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	oxidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	peroxidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )	Mn-peroxidáza (nM min <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )
Z01	<i>Mycena galericulata</i>	0,0 ± 0,0	10,4 ± 0,2	8,4 ± 1,8	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	20,2 ± 10,0
Z02	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	29,2 ± 3,5	16,8 ± 3,4	12,7 ± 3,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	8,5 ± 5,5
Z03	<i>Dipodascus australiensis</i>	17,5 ± 0,9	27,7 ± 16,6	13,3 ± 1,5	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	54,2 ± 27,1
Z07	<i>Pluteus galeroideus</i>	30,0 ± 0,0	44,2 ± 19,5	20,5 ± 5,5	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2	14,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0
Z09	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	9,8 ± 0,2	12,2 ± 7,3	10,4 ± 3,9	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,3 ± 3,3
Z10	<i>Crepidotus applanatus</i>	23,6 ± 0,2	10,2 ± 0,1	60,9 ± 44,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	31,0 ± 4,1
Z12	<i>Ganoderma applanatum</i>	13,9 ± 0,2	24,3 ± 6,4	10,2 ± 4,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,6 ± 5,5
Z13	<i>Hypholoma fasciculare</i>	13,3 ± 1,4	11,4 ± 6,9	17,9 ± 15,3	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Z14	<i>Mycena romagnesiana</i>	3,8 ± 1,3	20,5 ± 10,6	31,1 ± 19,1	7,9 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,6 ± 0,6	37,6 ± 21,1
Z15	<i>Lactarius subdulcis</i>	6,7 ± 0,1	22,2 ± 4,3	29,4 ± 15,4	0,9 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	13,9 ± 7,5
Z16	<i>Gymnopus dryophilus</i>	18,2 ± 0,8	15,6 ± 1,7	12,6 ± 1,3	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,9 ± 0,1	106,6 ± 35,7
Z17	<i>Lactarius subdulcis</i>	0,7 ± 0,2	39,0 ± 13,9	26,0 ± 9,5	26,5 ± 0,3	18,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	53,1 ± 28,9
Z18	<i>Laccaria amethystina</i>	31,8 ± 0,7	24,3 ± 2,1	25,8 ± 2,5	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,8 ± 4,4
Z19	<i>Tyromyces kmetii</i>	13,4 ± 0,2	1,8 ± 1,1	2,9 ± 1,4	3,3 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1	3,3 ± 3,3
Z20	<i>Polyporus varius</i>	18,1 ± 0,5	24,4 ± 10,9	20,9 ± 3,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	20,0 ± 12,5
Z21	<i>Athelia rolfsii</i>	18,7 ± 0,1	22,9 ± 0,6	14,6 ± 2,3	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	11,3 ± 2,7
Z22	<i>Fomitopsis pinicola</i>	7,6 ± 0,3	1,9 ± 1,0	3,0 ± 1,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,4 ± 5,4
Z23	<i>Kretzschmaria deusta</i>	20,2 ± 1,9	35,2 ± 10,2	16,8 ± 5,4	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	80,7 ± 46,0
Z24	<i>Ganoderma applanatum</i>	19,7 ± 0,3	14,5 ± 0,5	59,9 ± 25,6	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3
Z25	<i>Marasmius alliaceus</i>	17,7 ± 0,6	8,0 ± 0,5	4,4 ± 1,3	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	16,0 ± 1,4
Z26	<i>Fomes fomentarius</i>	27,8 ± 0,4	34,2 ± 14,6	21,8 ± 1,4	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0
Z27	<i>Pluteus cervinus</i>	15,8 ± 0,1	10,2 ± 1,4	7,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Z28	<i>Fomes fomentarius</i>	12,5 ± 1,7	15,7 ± 1,4	7,0 ± 3,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,2 ± 1,6
Z29	<i>Pluteus cervinus</i>	11,7 ± 0,2	24,4 ± 7,2	29,6 ± 17,6	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	33,5 ± 17,0
Z30	<i>Lycoperdon cf. pyriforme</i>	16,9 ± 3,9	16,1 ± 1,0	15,4 ± 2,7	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,4	79,6 ± 43,1
Z31	<i>Pluteus cervinus</i>	10,8 ± 0,4	12,1 ± 3,6	34,8 ± 18,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	57,3 ± 14,9
Z32	<i>Megacollybia platyphylla</i>	8,1 ± 1,4	34,9 ± 14,1	42,0 ± 16,7	6,5 ± 0,0	0,9 ± 0,1	8,3 ± 0,2	86,9 ± 27,4
Z33	<i>Hypholoma sublateralium</i>	15,1 ± 1,2	19,8 ± 1,5	48,8 ± 18,8	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	8,2 ± 2,9	18,2 ± 18,2
Z34	<i>Mycena romagnesiana</i>	2,3 ± 0,7	23,2 ± 1,1	23,1 ± 2,3	14,6 ± 0,3	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,2	77,4 ± 39,9
Z35	<i>Pluteus cervinus</i>	15,6 ± 0,9	34,1 ± 1,1	19,8 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,1 ± 3,3
Z36	<i>Fomitopsis pinicola</i>	5,4 ± 0,0	32,6 ± 2,5	22,9 ± 1,3	8,4 ± 8,2	2,4 ± 1,9	0,0 ± 0,0	33,2 ± 6,9
Z37	<i>Mycena laevigata</i>	22,1 ± 0,5	42,1 ± 14,2	41,6 ± 20,9	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,5 ± 0,7
Z38	<i>Crepidotus cf. applanatus</i>	3,3 ± 0,4	30,7 ± 4,0	27,2 ± 6,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	8,4 ± 5,6
Z39	<i>Kretzschmaria deusta</i>	20,5 ± 0,2	31,0 ± 0,3	29,3 ± 9,8	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,4	110,5 ± 85,4
Z46	<i>Hypoxylon cohaerens</i>	26,4 ± 0,1	13,7 ± 4,3	38,8 ± 18,8	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,5 ± 1,1
Z47	<i>Lycoperdon perlatum</i>	5,8 ± 0,6	9,8 ± 3,1	27,7 ± 11,3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	3,9 ± 1,6	209,2 ± 120,9
Z50	<i>Lycoperdon perlatum</i>	33,4 ± 0,7	29,0 ± 4,2	25,0 ± 8,8	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,8 ± 1,7	1,7 ± 1,7
Z51	<i>Galerina cf. marginata</i>	35,7 ± 0,6	43,8 ± 11,7	30,4 ± 5,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	6,4 ± 2,3	155,3 ± 9,3
Z52	<i>Sarcomyxa serotina</i>	16,1 ± 0,8	15,6 ± 1,7	29,4 ± 17,7	2,1 ± 0,0	0,4 ± 0,2	12,0 ± 6,2	74,1 ± 47,3
Z53	<i>Trametes versicolor</i>	12,4 ± 0,2	25,2 ± 7,4	11,2 ± 5,5	1,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	2,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Z54	<i>Fomitopsis pinicola</i>	5,8 ± 0,2	11,3 ± 0,2	10,7 ± 1,5	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	9,7 ± 7,2
Z55	<i>Trametes versicolor</i>	4,7 ± 0,0	19,8 ± 9,3	8,3 ± 0,5	5,1 ± 0,0	1,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Z56	<i>Fungal sp.</i>	12,0 ± 0,3	16,5 ± 1,5	36,1 ± 18,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Z57	<i>Trametes versicolor</i>	8,9 ± 0,0	16,5 ± 1,6	15,0 ± 2,4	8,0 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Z58	<i>Trametes versicolor</i>	10,0 ± 0,1	47,2 ± 23,3	34,3 ± 20,6	2,9 ± 0,0	1,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	21,0 ± 2,1
Z59	<i>Scleroderma citrinum</i>	64,7 ± 4,5	19,7 ± 0,4	35,4 ± 16,2	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	4,6 ± 4,3
Z60	<i>Lycoperdon cf. perlatum</i>	8,7 ± 0,7	14,2 ± 4,0	5,4 ± 2,7	3,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,0	2,4 ± 2,4
Z61	<i>Fomes fomentarius</i>	13,1 ± 0,7	16,5 ± 1,9	37,0 ± 21,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	5,6 ± 4,1
Z62	<i>Ganoderma applanatum</i>	21,3 ± 0,2	47,0 ± 12,2	25,5 ± 2,4	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	6,6 ± 3,7
Z63	<i>Ganoderma applanatum</i>	19,8 ± 0,6	15,3 ± 1,0	11,3 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	8,1 ± 2,7

Tabulka 10 Aktivita enzymů u jednotlivých vzorků plodnic. Hodnoty jsou vztažené na g sušiny. V tabulkách (A, B, C) jsou zahrnuty průměry jednotlivých měření a střední chyby průměru.

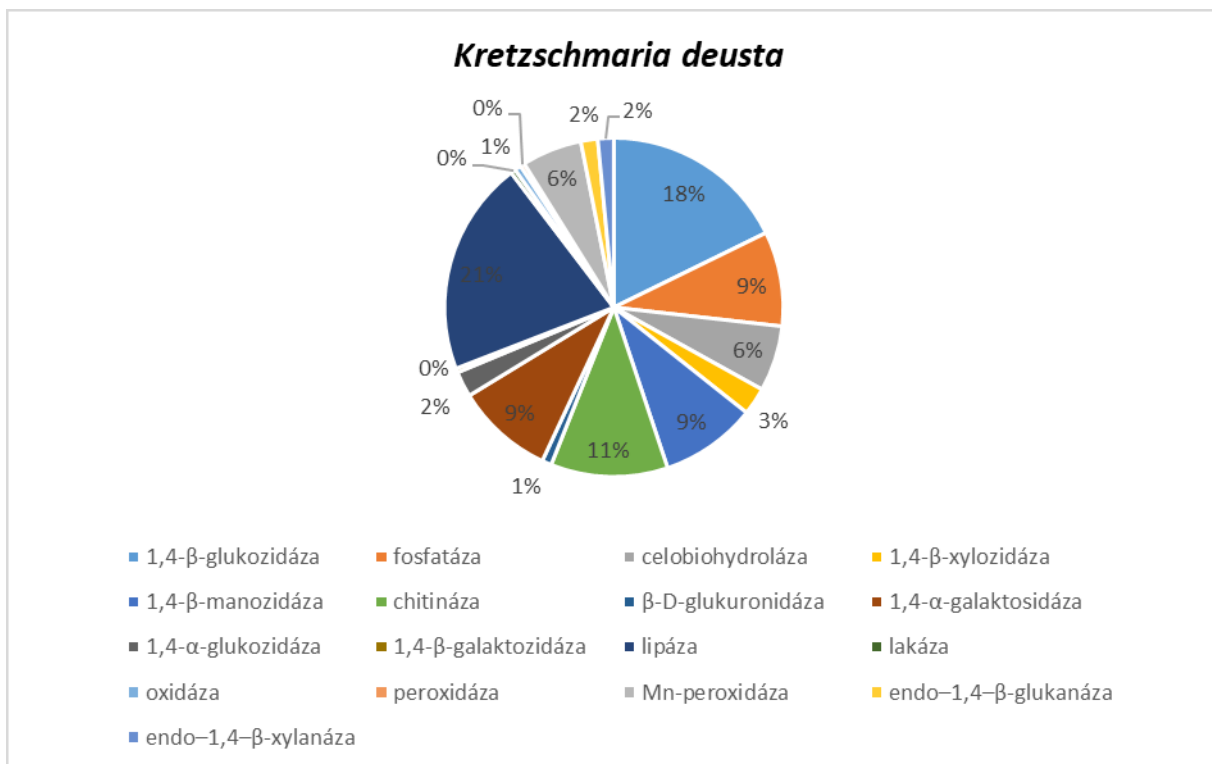


Graf 5 NMDS metoda (program Past) stanovení enzymatické aktivity u odebraných plodnic. K výpočtu byl použit Bray-Curtisův index ( $p < 0,05$ ).

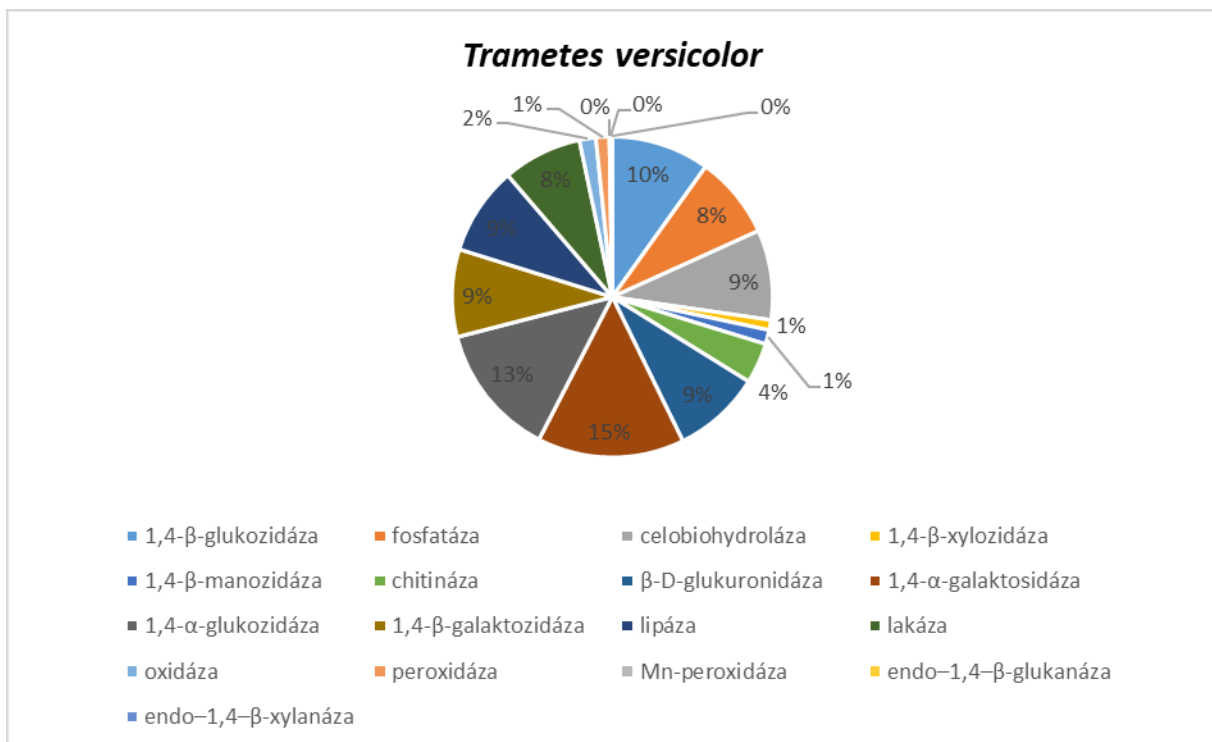
Na grafu 6 jsou zobrazeny plodnice a jejich enzymatické aktivity vzhledem k zařazení do skupin bílé, hnědé a měkké hniloby. Podle grafu lze usuzovat, že některé houby bílé a hnědé hniloby mají rozdílné spektrum produkce enzymatických aktivit, ale neplatí to pro všechny. Na dalších grafech 7, 8, 9 jsou vybrány tři plodnice (abundantních druhů) pro detailnější popis jednotlivých procentuálních aktivit enzymů v rámci rozdílu mezi houbami měkké, bílé a hnědé hniloby.



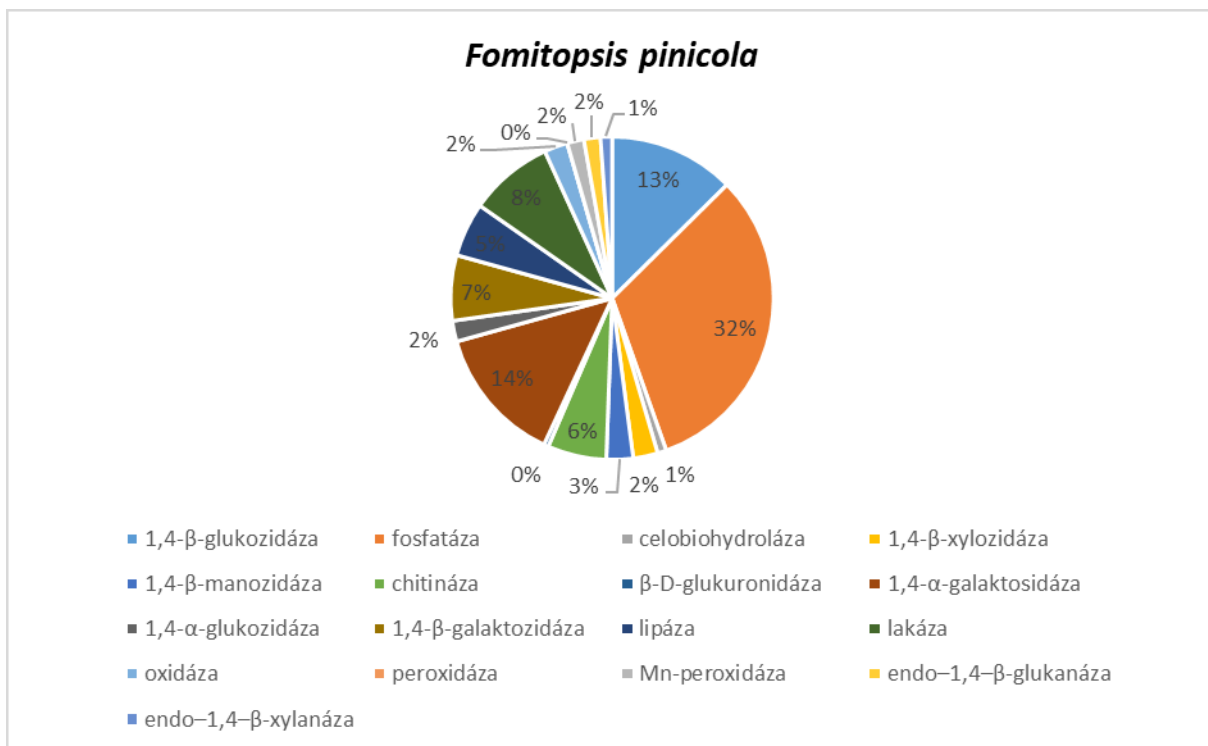
Graf 6 NMDS metoda (program Past) stanovení enzymatické aktivity u odebraných plodnic vzhledem k dekompozičním vlastnostem (zelená (houby bílé hniloby), černá (houby hnědé hniloby) a modrá (houby měkké hniloby)). K výpočtu byl použit Bray-Curtisův index ( $p < 0,05$ ).



Graf 7 Spektrum enzymatických aktivit u vzorku Z39: *Kretzschmaria deusta*. Zástupce hub měkké hniloby.



Graf 8 Spektrum enzymatických aktivit u vzorku Z57: *Trametes versicolor*. Zástupce hub bílé hniloby.



Graf 9 Spektrum enzymatických aktivit u vzorku Z36: *Fomitopsis pinicola*. Zástupce hub hnědé hniloby.

## **5.2 Tlející dřevo**

### **5.2.1 Analýza prvkového složení**

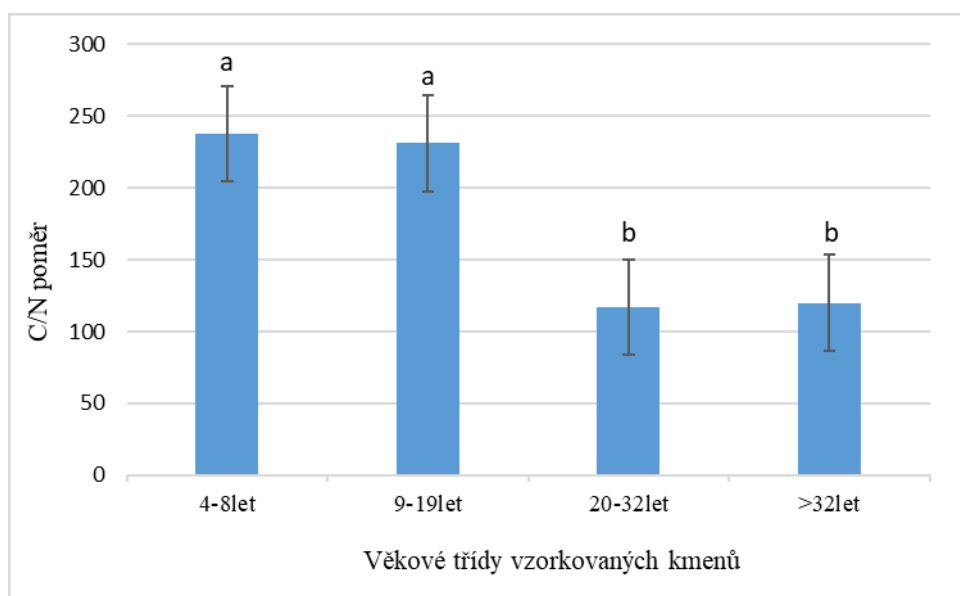
Podobně jako u plodnic byly měřeny obsahu důležitých prvků v lyofilizovaném zetlelém dřevě. Ve 118 vybraných vzorcích dřeva se stanovoval obsah uhlíku, dusíku a hodnoty pH, vypočítal se C/N poměr (tabulka 11). Vzorky byly odebírány z identických kmenů jako v roce 2013, aby bylo umožněno jejich srovnání, celkem ze 4 věkových kategorií dle délky rozkladu kmene v ležící poloze (graf 10-15).

číslo	strom	rok	N%	C%	pH	poměr C/N
2	BK	2008	0,2	40,2	4,6	167
3	BK	1997	0,5	42,7	4,16	94
4	SM	2013	0,2	47,1	4,29	262
5	SM	2013	0,2	49,3	3,88	246
6	BK	2013	0,7	41,7	4,35	63
7	BK	2013	0,3	44,8	5,38	136
8	BK	2013	0,2	47,5	5,05	251
9	JD	1997	0,2	47,9	4,04	210
10	SM	2008	0,1	47,2	3,73	501
11	SM	2008	0,2	47,9	4,64	218
13	SM	2008	0,2	45,6	4,46	253
14	SM	1997	0,2	52,0	4,14	208
15	SM	2008	0,2	47,8	4,26	200
16	SM	1975	0,2	47,7	4,48	224
16	SM	1975	0,4	49,2	3,75	110
17	SM	2008	0,3	43,8	4,33	141
18	SM	2013	0,1	48,0	4,17	322
19	SM	1997	0,6	51,8	4,29	89
20	SM	2013	0,1	47,6	4,58	446
21	JD	1997	0,4	49,5	3,92	134
22	SM	2013	0,1	48,1	3,66	391
23	SM	1997	0,3	43,5	4,38	150
24	SM	2008	0,1	48,6	3,7	426
25	JD	1997	0,9	50,1	4,35	58
26	BK	2013	0,3	47,4	4,39	149
27	JD	1975	0,9	50,2	4,07	59
28	BK	1997	1,1	45,9	4,55	43
29	BK	1997	0,3	47,4	5,1	144
30	SM	1997	0,5	51,0	4	101
31	BK	2008	0,5	49,6	5,36	96
32	BK	1997	1,7	47,6	3,9	28
33	BK	1997	1,0	35,9	4,3	38
34	JD	1997	1,6	36,5	3,87	23
35	JD	2013	0,6	50,3	4,31	86
36	JD	1975	0,6	51,2	4,14	92
37	SM	1975	0,8	38,2	4,27	50
38	SM	1975	0,8	46,2	4,82	61
39	BK	1997	1,2	35,6	4,7	30
40	SM	1975	0,4	51,0	4,47	136
41	JD	1997	0,6	51,1	4,28	88
42	SM	1975	0,2	40,9	4,23	165
43	SM	1975	1,1	49,2	3,98	46
44	BK	2013	0,6	48,4	4,44	80
45	JD	2008	0,2	47,4	4,58	201
46	SM	1997	0,6	51,2	4,58	85
48	JD	2008	0,4	68,8	4,58	185
49	BK	2008	0,2	47,2	4,95	246
50	SM	2008	0,2	45,0	4	200
51	SM	2008	0,2	51,2	3,76	322
53	JD	1975	0,5	52,4	3,99	98
55	BK	2008	0,3	47,8	4,5	149
56	JD	2008	0,7	49,6	4,26	68
57	BK	1997	0,5	46,2	4,69	85
58	BK	1975	0,7	51,7	5,34	73
59	BK	1997	0,4	46,8	4,69	115
60	JD	2008	0,2	47,6	4,2	257
61	JD	2008	0,1	50,4	4,5	380
62	SM	2008	0,1	51,4	3,64	449
63	JD	2008	0,2	49,1	4,26	216

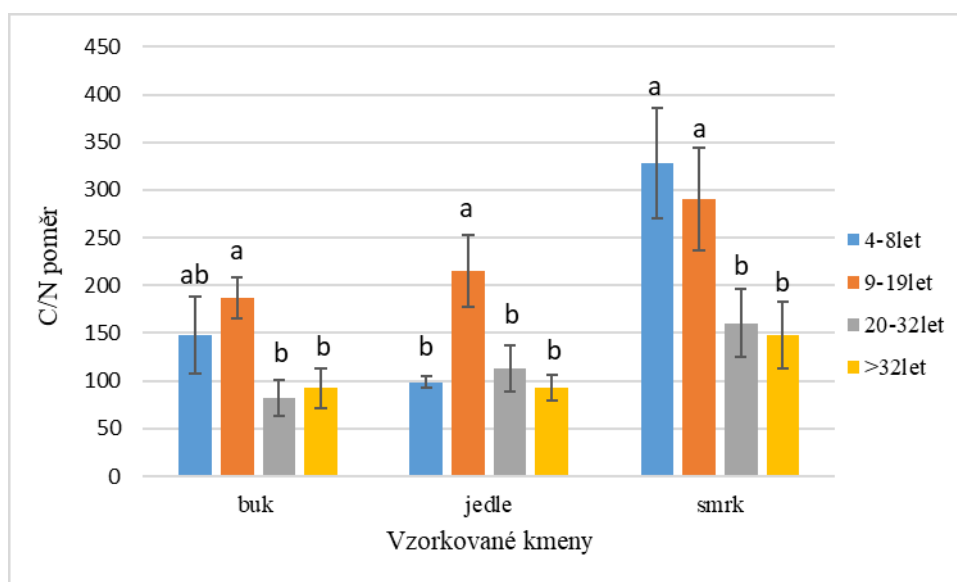
číslo	strom	rok	N%	C%	pH	poměr C/N
64	JD	2008	0,3	49,3	4,02	145
65	SM	1975	0,2	48,1	3,97	268
66	SM	2008	0,1	47,5	3,94	350
67	SM	1997	0,1	51,1	3,64	348
69	BK	2008	0,4	48,8	5,02	131
70	JD	2008	0,1	48,4	4,6	344
71	JD	1997	0,4	37,8	4,44	88
73	BK	2008	0,2	48,0	4,57	229
74	SM	1975	0,7	54,4	4,04	81
75	SM	2013	0,2	53,6	3,74	219
76	SM	2013	0,6	51,3	3,83	91
77	SM	1997	0,5	58,2	4,36	125
78	SM	2008	0,5	56,0	4,15	106
79	BK	1997	1,0	45,7	4,14	44
80	SM	1997	0,4	51,5	4,32	141
81	JD	1997	0,5	54,6	4,06	107
82	JD	1997	0,3	49,7	3,78	191
83	BK	2008	0,2	47,0	4,81	224
84	BK	1997	0,3	46,6	3,71	145
85	JD	2008	0,3	49,4	4,25	170
86	BK	2008	0,2	48,5	5	230
87	SM	2013	0,2	50,1	4,17	201
88	SM	2013	0,1	47,6	3,7	454
88	SM	2013	0,1	48,8	3,7	438
89	SM	2013	0,1	48,9	4,6	539
90	SM	1997	0,2	47,0	4,24	276
91	SM	1975	0,1	39,4	3,92	278
92	SM	1975	0,3	52,1	3,91	186
93	SM	1997	0,4	49,9	4,55	123
94	BK	1997	0,4	43,4	3,96	103
95	JD	2008	0,2	47,9	4,3	296
96	BK	2013	0,5	49,4	4,89	99
97	JD	1997	0,7	48,9	4,24	68
98	JD	1997	0,5	49,2	3,89	102
99	JD	2008	0,2	47,7	4,05	214
100	JD	1975	0,4	56,5	4,19	148
101	BK	1975	1,1	49,9	4,39	44
102	JD	2008	0,2	48,7	5,42	257
103	JD	1975	0,6	43,5	4,05	69
105	SM	1975	0,3	45,9	4,04	167
106	BK	2008	0,3	47,8	4,76	140
107	JD	1997	0,5	53,0	4,37	110
108	BK	1997	0,5	52,5	3,99	110
109	BK	2008	0,2	46,7	5,75	215
110	BK	2013	0,7	45,5	4,74	69
112	JD	1975	0,9	52,7	4,36	60
113	BK	1975	0,5	37,8	4,4	69
114	BK	1975	0,3	47,2	3,7	180
115	BK	1975	0,5	48,3	3,84	94
117	SM	2008	0,1	46,8	4,3	317
118	JD	1975	0,4	47,9	4,32	122
119	JD	2013	0,4	46,8	4,36	112
120	JD	1997	0,5	46,7	5,64	96
X1	JD	2008	0,5	46,5	5,09	91
X2	JD	1997	0,3	51,9	4,26	194
X3	BK	2008	0,2	47,7	5,44	230
X4	BK	2013	0,1	48,6	4,24	337
X6	SM	1997	0,4	51,4	4,54	115
X7	JD	2008	0,3	48,0	4,44	185

Tabulka 11 Hodnoty obsahu C, N, pH a vypočteného C/N poměru u vzorků zetlelého dřeva odebraného v roce 2017. V tabulce jsou uvedeny 4 věkové třídy (>32let (rok 1975), 20-32let (rok 1997), 9-19let (rok 2008), 4-8let (rok 2013)) a druhy stromů (BK-buk, JD- jedle, SM-smrk). Hodnoty N a C jsou v hmotnostních procentech.

Byly naměřeny hodnoty C/N poměru u vzorků dřeva ve čtyřech věkových třídách a tří druhů stromů. Celkově docházelo k postupnému snižování C/N poměru, nejvyšší naměřený počáteční poměr byl ve věkové třídě 4-8let (tabulka 11 a graf 10). V rámci porovnání vývoje jednotlivých druhů stromů v jednotlivých věkových třídách (graf 11) bylo zaznamenáno klesání hodnot C/N poměru u buku, jedle i smrku (ačkoliv u buku a jedle nebyl dostatek vzorků z věkové třídy 4-8let).



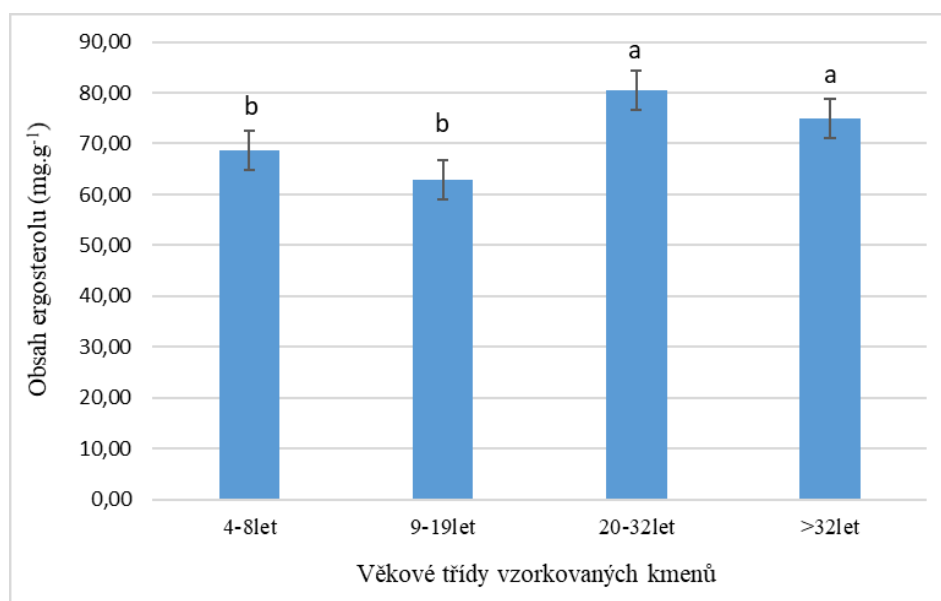
Graf 10 Celková variabilita v hodnotách (C/N poměru) v rámci jednotlivých věkových tříd bez ohledu na druh stromu. Uvedeny jsou průměry se střední chybou průměru. Pro zjištění statistických rozdílů byla použita metoda Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



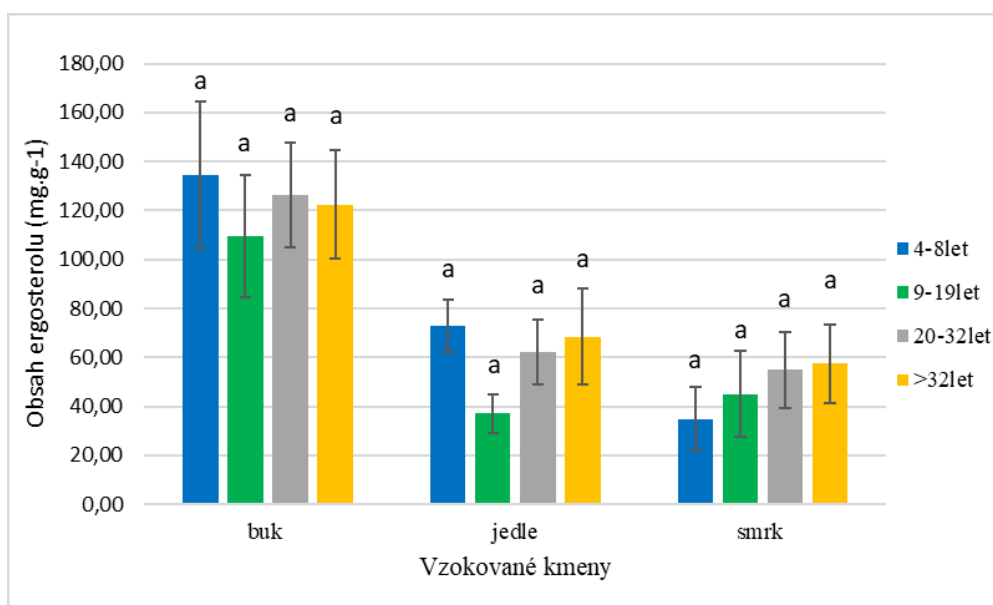
Graf 11 Variabilita v hodnotách (C/N poměru) u jednotlivých druhů stromů. Uvedeny jsou průměry se střední chybou průměru. Pro zjištění statistických rozdílů byla použita metoda Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



Byly naměřeny hodnoty ergosterolu u čtyř věkových tříd a třech druhů stromů. Celkově byl obsah ergosterolu naměřen nejvyšší u více rozložených kmenů (20-32let a >32let, graf 12). Ve všech bukových kmenech byly naměřeny hodnoty ergosterolu přibližně dvakrát větší než u ostatních druhů dřeva ve všech věkových třídách. V rámci porovnání vývoje biomasy ergosterolu u jednotlivých stromů (v průběhu rozkladu) nebyly zjištěny statistické rozdíly (graf 13).

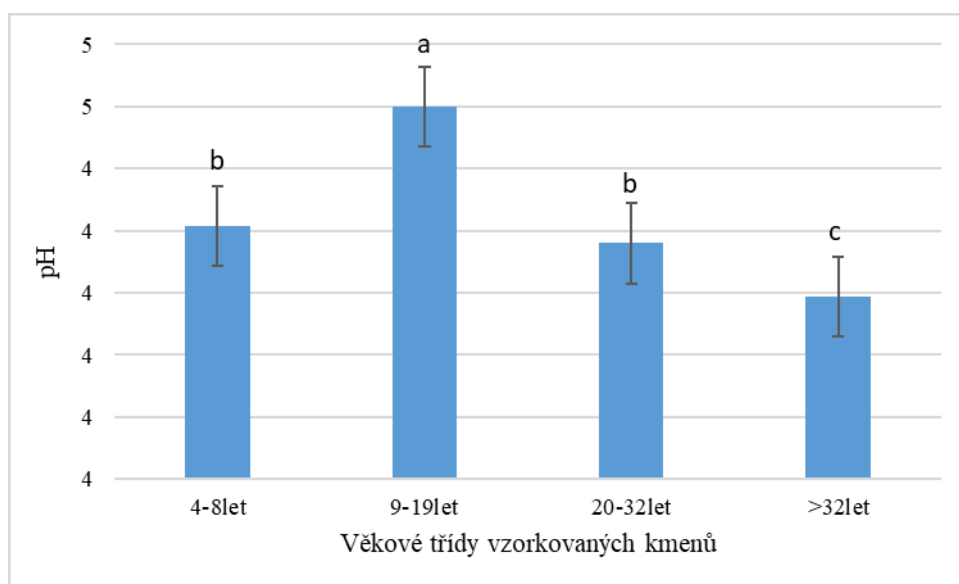


Graf 12 Kvantifikace houbové biomasy v tlejícím dřevě v rámci jednotlivých věkových bez ohledu na druh stromu. Uvedeny jsou průměry se střední chybou průměru a jsou vztažené na g sušiny ( $p < 0,05$  metoda Fisherův LSD post-hoc test).

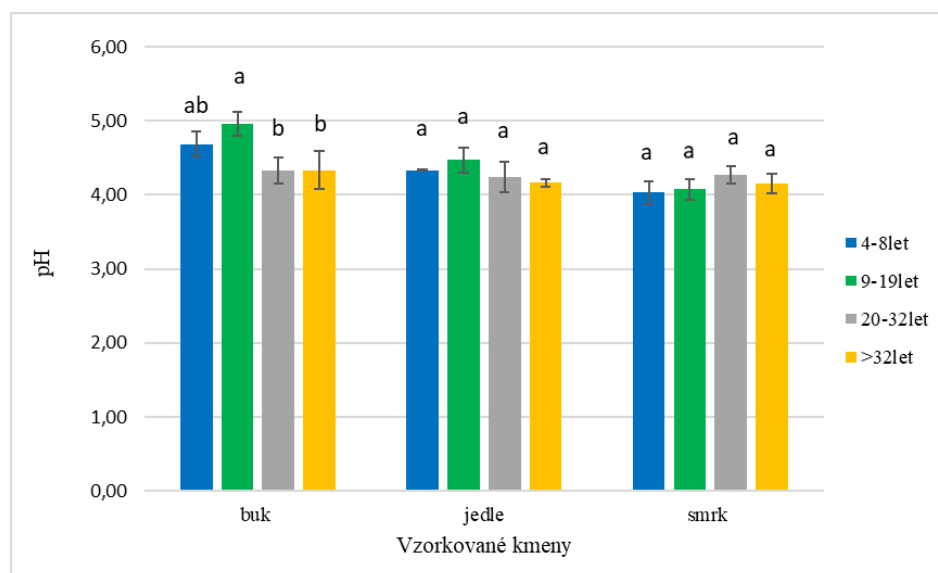


Graf 13 Kvantifikace houbové biomasy v čase u jednotlivých druhů stromů. Uvedeny jsou průměry se střední chybou průměru a jsou vztažené na g sušiny ( $p < 0,05$  metoda Fisherův LSD post-hoc test).

Hodnoty pH se v naměřených vzorcích pohybovaly v rozmezí 3,64–5,75. Celkově docházelo ke snižování pH (nejnižší naměřeno u věkové třídy >32let, graf 14). Počáteční nízké pH může být ovlivněno i nedostatečným počtem vzorků. Ze statistického hlediska jsou rozdíly významné ( $p < 0,05$ ) pouze u buku mezi věkovými třídami (graf 15). U ostatních stromů a věkových tříd nebyl zaznamenán statistický rozdíl v průběhu doby rozkladu (graf 15).



Graf 14 Variabilita v hodnotách (pH) u tlejícího dřeva v rámci jednotlivých věkových tříd bez ohledu na druh stromu. Uvedeny jsou průměry se střední chybou průměru. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

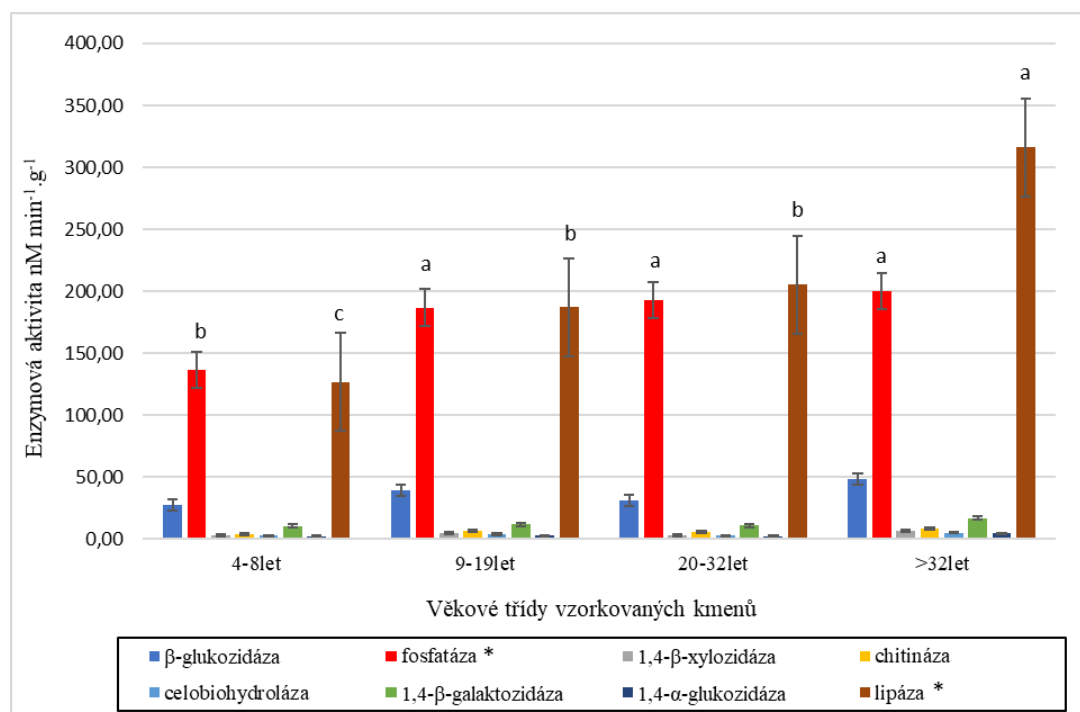


Graf 15 Variabilita v hodnotách (pH) v čase u jednotlivých druhů stromů. Uvedeny jsou průměry se střední chybou průměru. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

## 5.2.2 Enzymová aktivita

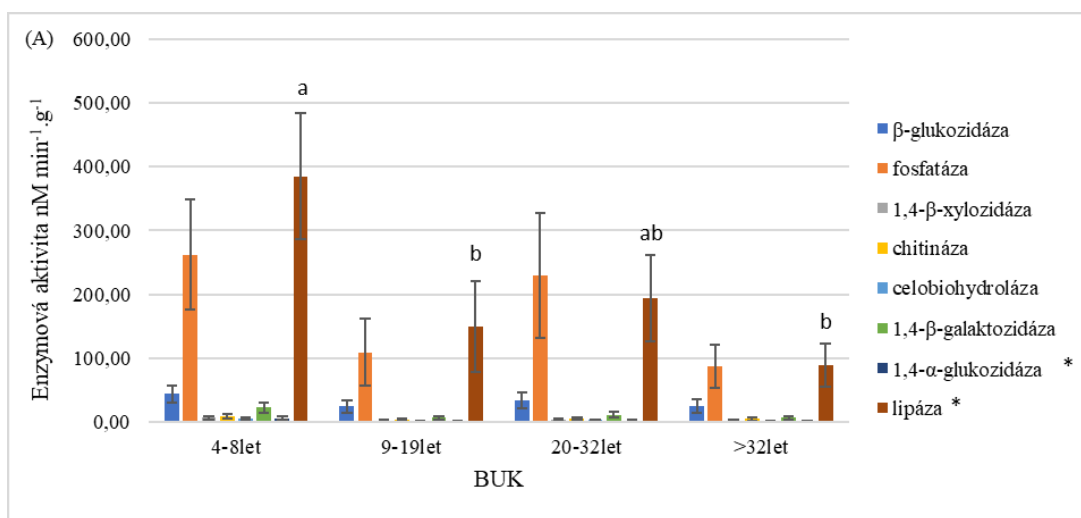
U vzorků tlejícího dřeva byla stanovována enzymatická aktivita 1,4- $\beta$ -glukosidázy, fosfatázy, chitinázy, celobiohydrolázy, 1,4- $\alpha$ -glukosidázy, 1,4- $\beta$ -xylosidázy, 1,4- $\beta$ -manosidázy, 1,4- $\beta$ -galaktosidázy, lipázy (triacylglycerolacylhydroláza),  $\beta$ -D-glukuronidázy, 1,4- $\alpha$ -galaktosidázy, endo-1,4- $\beta$ -glukanázy, endo-1,4- $\beta$ -xylanázy, lakázy, manganová peroxidázy (MnP), oxidázy, peroxidázy. Zvolené spektrum enzymů reflektovalo mikrobiální způsob rozkladu dřevní hmoty v přirozeném prostředí. V naměřených enzymových aktivitách byly pozorovány velmi výrazné rozdíly (graf 16-22).

Vysoké aktivity fosfatázy a lipázy byly detekovány ve všech věkových třídách bez ohledu na druh tlejícího dřeva (graf 16). Aktivity fosfatázy a lipázy dosahovaly až 200-300 nM min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup> v jednotlivých kmenech. Aktivity  $\beta$ -glukosidázy, <50 nM min<sup>-1</sup> · g<sup>-1</sup>, byly rovněž detekovány u všech tlejících kmenů. U všech věkových tříd a vzorkovaných kmenů byly zaznamenány aktivity všech vybraných enzymů (pouze 1,4- $\alpha$ -glukosidáza u jedle ve věkové třídě 4-8let vykazovala nulovou aktivitu, graf 20).

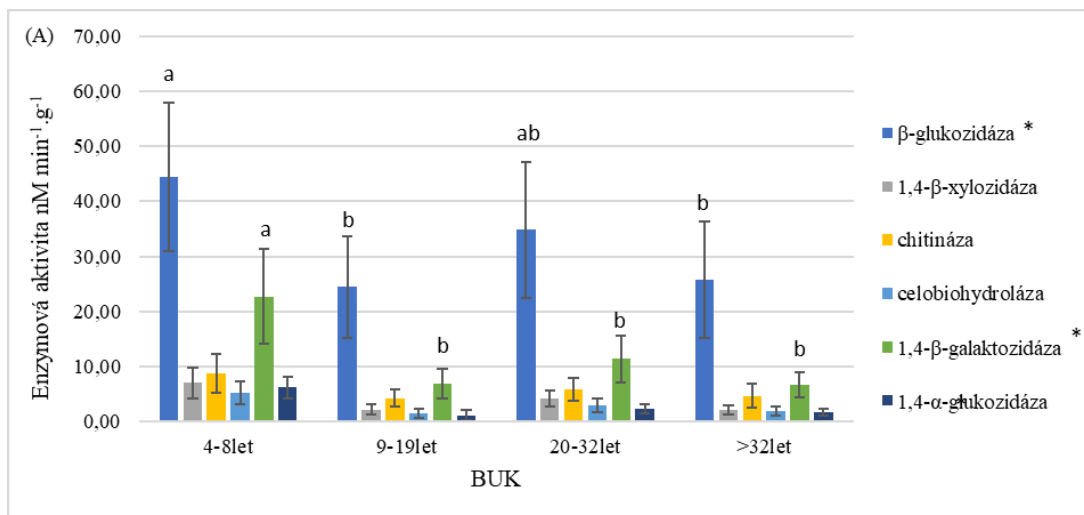


Graf 16 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF značených substrátů ve věkových třídách bez ohledu na druh stromu (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztahované na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

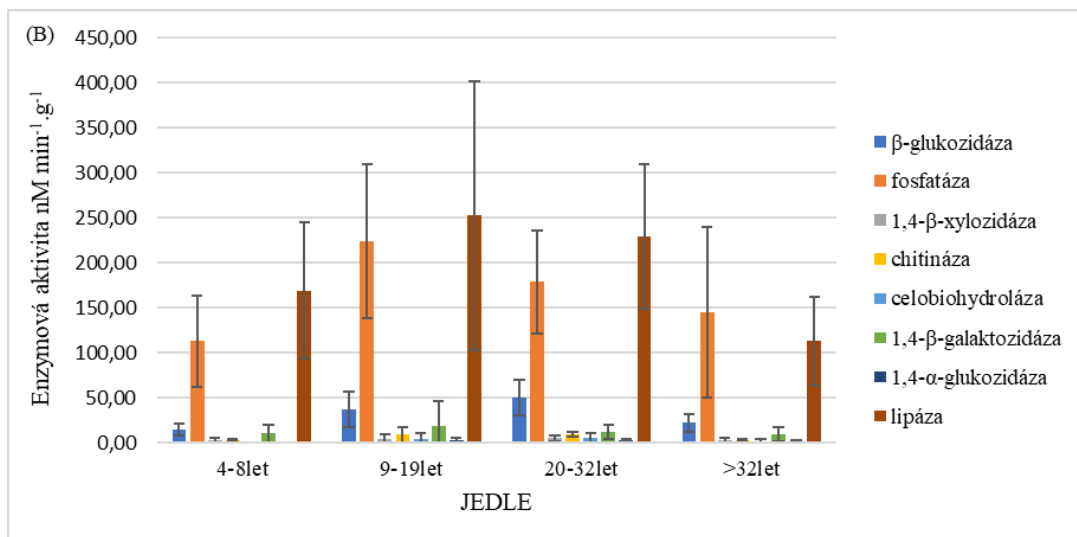
Mezi jednotlivými druhy stromů vykazovala věková třída >32 let menší aktivitu většiny enzymů. U buku byly zjištěny rozdíly mezi fosfatázou, lipázou, 1,4- $\alpha$ -glukosidázou, 1,4- $\beta$ -glukosidázou a 1,4- $\beta$ -galaktosidázou (graf 17, 18). U jedle byly zjištěny rozdíly mezi fosfatázou, lipázou, 1,4- $\alpha$ -glukosidázou (chyběla ve věkové třídě 4-8let), 1,4- $\beta$ -glukosidázou (graf 19, 20) a u smrku byly zjištěny rozdíly mezi fosfatázou, lipázou a 1,4- $\beta$ -glukosidázou (graf 21, 22).



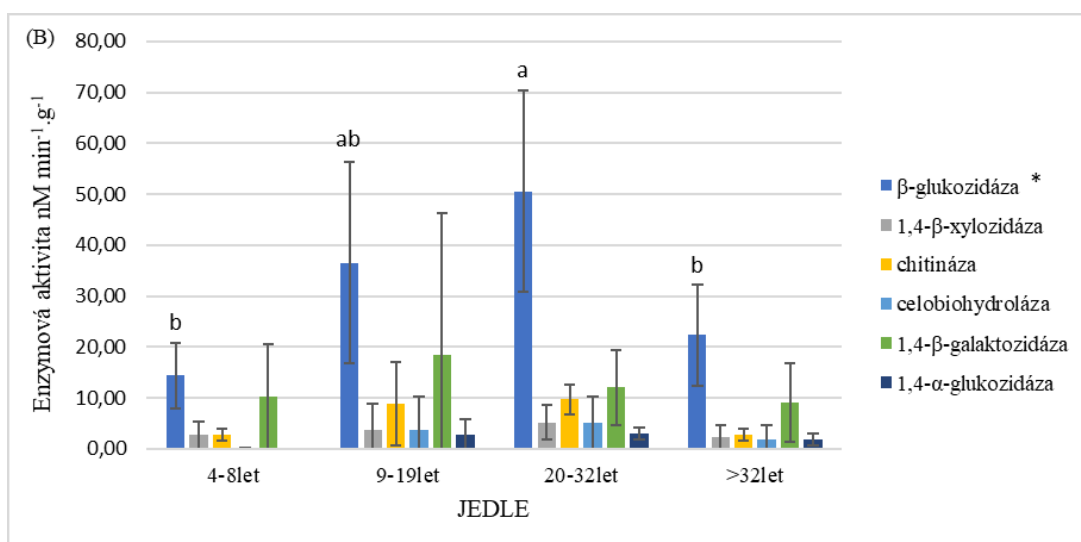
Graf 17 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF značených substrátů u buku (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc.



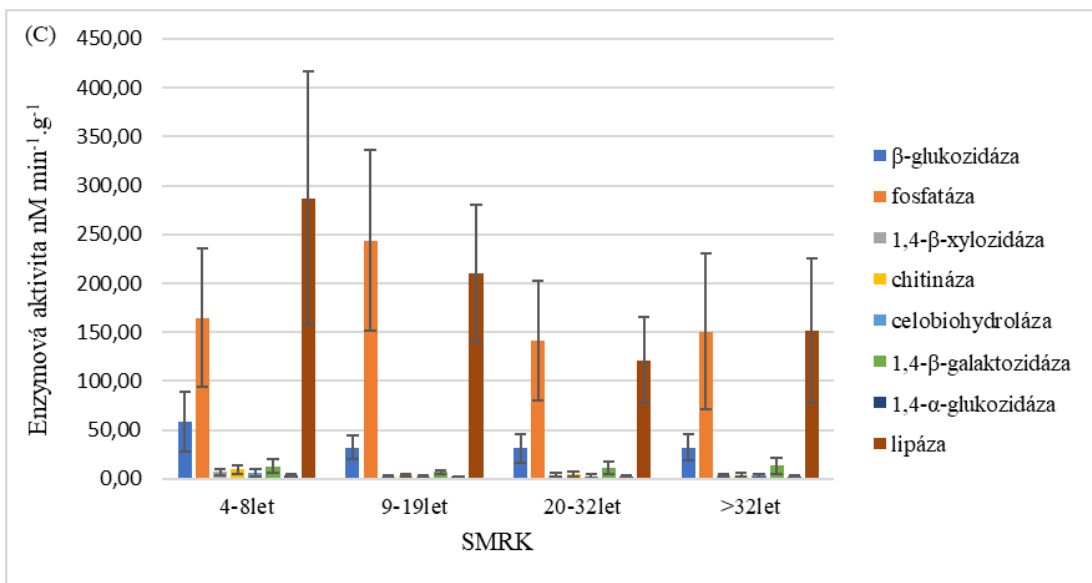
Graf 18 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF (bez lipázy a fosfatázy) značených substrátů u buku (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc.



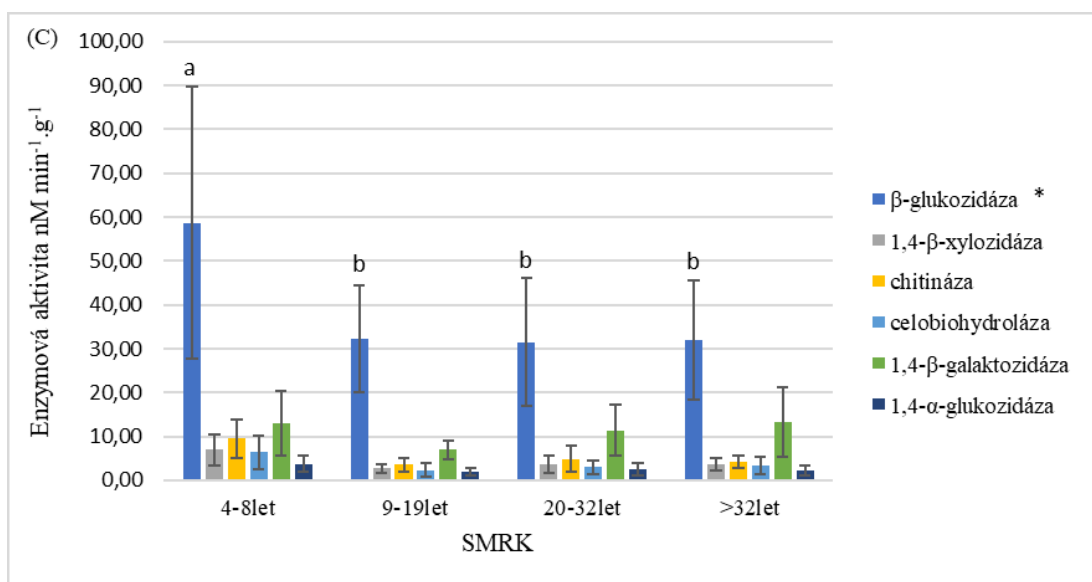
Graf 19 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF značených substrátů u jedle (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD.



Graf 20 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF (bez lipázy a fosfatázy) značených substrátů u jedle (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD.



Graf 21 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF značených substrátů u smrku (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

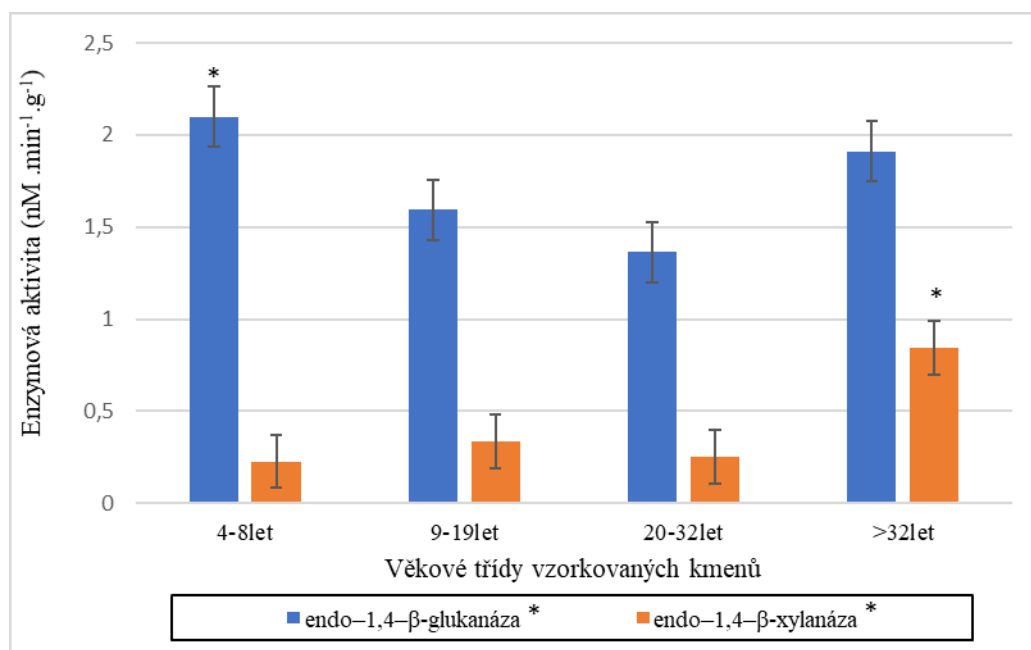


Graf 22 Naměřené enzymatické aktivity enzymů měřených s použitím MUF (bez lipázy a fosfatázy) značených substrátů u smrku (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

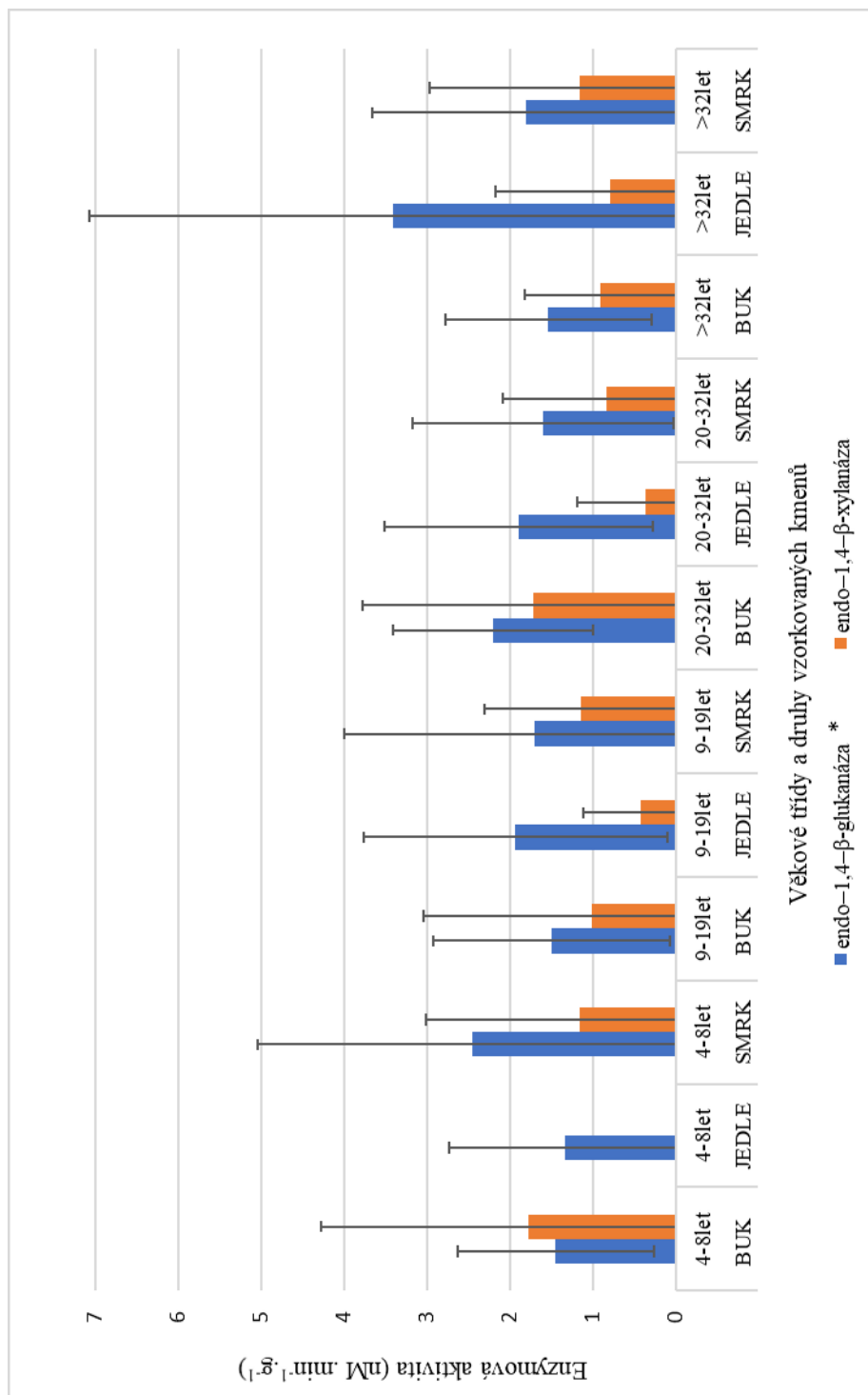
Celkově byly hodnoty endoštěpících enzymů (endo-1,4- $\beta$ -glukanázy a endo-1,4- $\beta$ -xylanázy, graf 23) a oxidativních enzymů (oxidáza, peroxidáza, Mn-peroxidáza a lakáza, graf 25), oproti předchozím, výrazně nižší. Aktivity se pohybovaly v rámci jednotek.

Ze statistického zhodnocení naměřených aktivit endoštěpících enzymů, byly zjištěny vyšší aktivity endo-1,4- $\beta$ -glukanázy oproti endo-1,4- $\beta$ -xylanázy u většiny stromů a většiny věkových tříd. Vyšší hodnoty endo-1,4- $\beta$ -glukanázy byly detekovány spíše u věkových tříd 4-8 let a >32let (graf 24).

Ze statistického zhodnocení naměřených aktivit oxidativních enzymů, byly zjištěny vyšší aktivity oxidázy (jedle) a lakázy (jedle) u věkových tříd 4-8let a vyšší aktivity lakázy (buk) a peroxidázy (jedle) u věkové třídy >32let. Porovnávaly se rozdíly mezi jednotlivými druhy stromů v rámci jedné věkové třídy a u druhu stromů ve všech věkových třídách (vývoj enzymatické aktivity, graf 26).

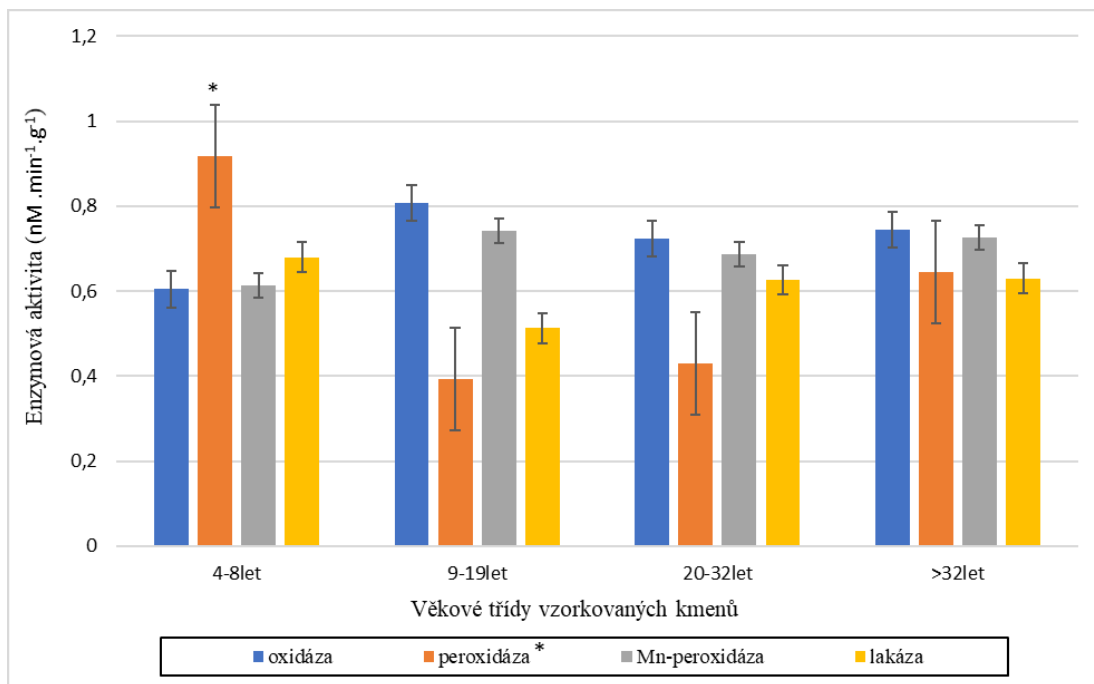


Graf 23 Naměřené aktivity enzymů endo-1,4- $\beta$ -glukanázy a endo-1,4- $\beta$ -xylanázy enzymů ve věkových třídách bez ohledu na druh stromu (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

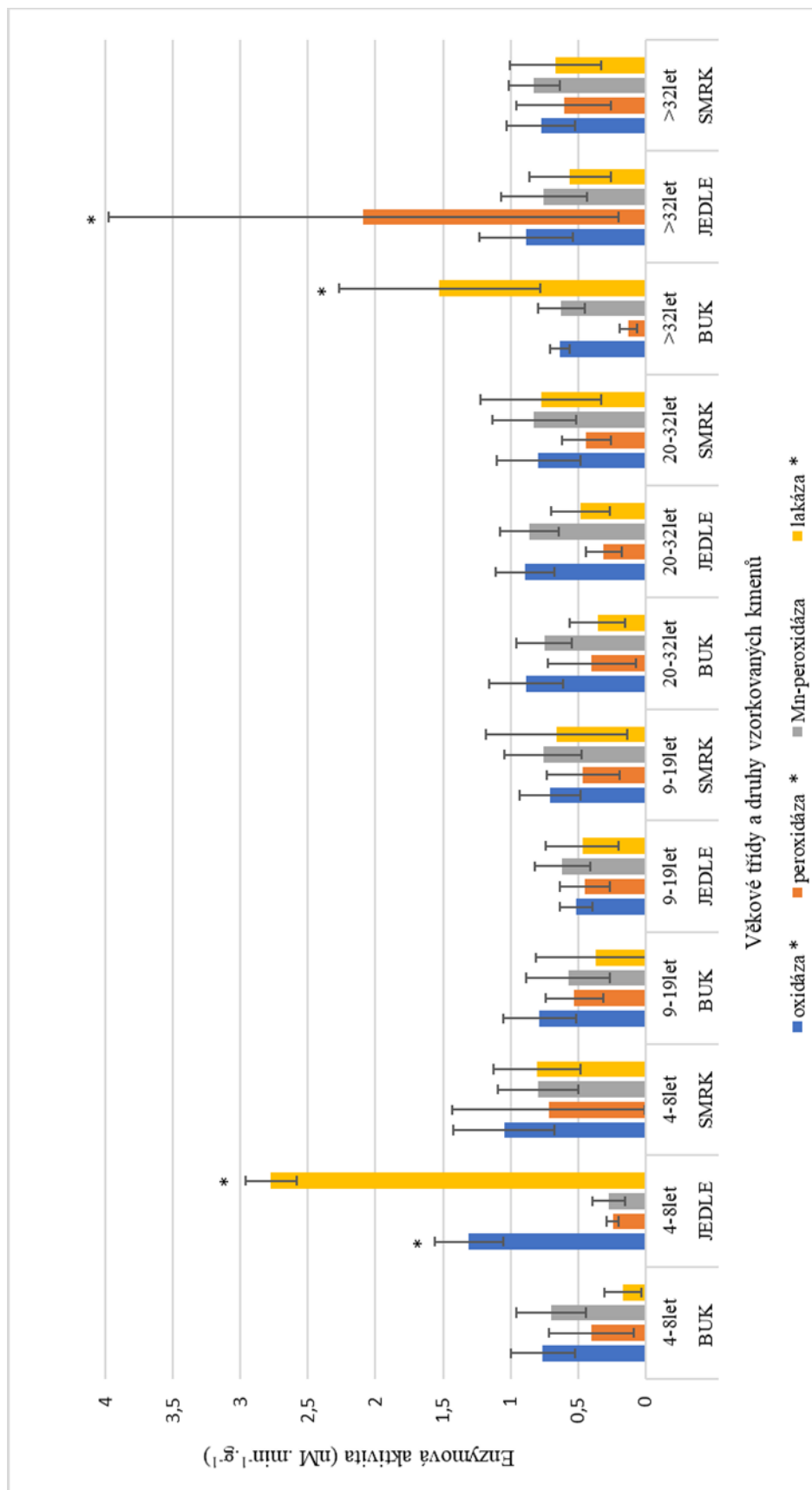


Graf 24 Naměřené aktivity enzymů endo-1,4-β-glukanázy a endo-1,4-β-xylanázy enzymů ve věkových třídách s ohledem na druh stromu (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztahované na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).





Graf 25 Naměřené aktivity oxidativních enzymů ve věkových třídách bez ohledu na druh stromu (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažené na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



Graf 26 Naměřené aktivity oxidativních enzymů ve věkových třídách s ohledem na druh stromu (uvedeny jsou průměry naměřených hodnot a střední chyba průměru vztažená na g sušiny). Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

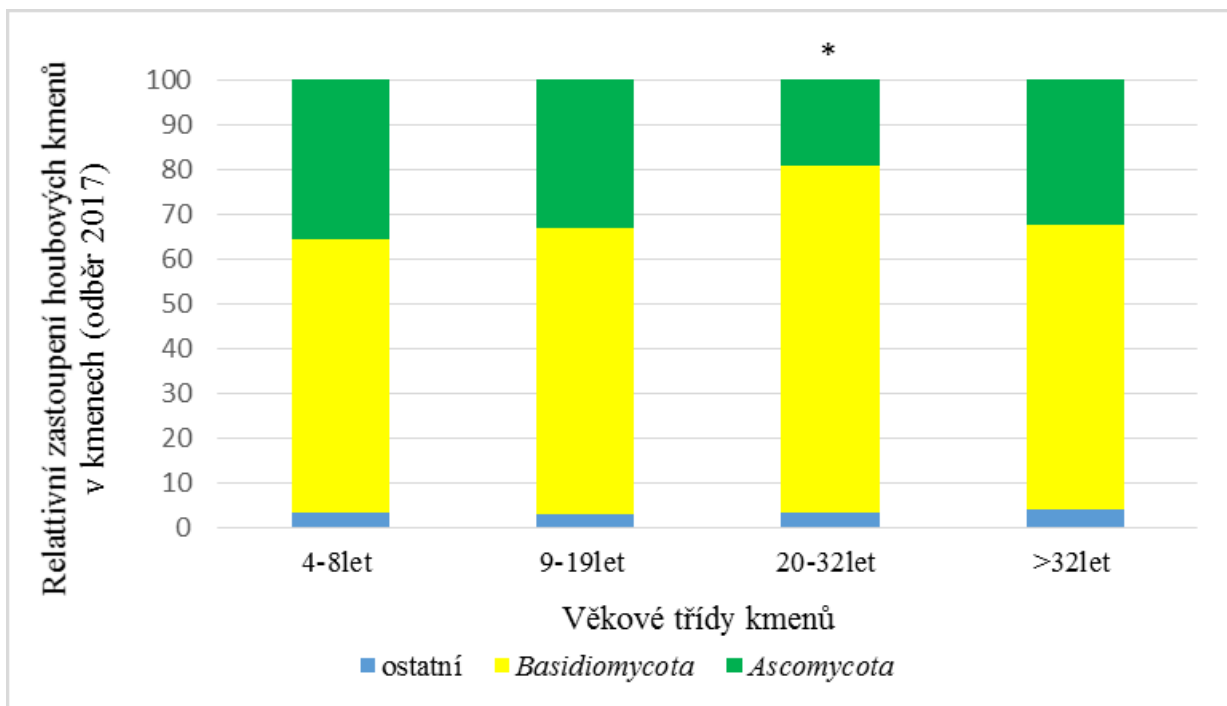
## 5.2.3 Identifikace hub v tlejícím dřevě

### 5.2.3.1 Identifikace hub v tlejícím dřevě odběr z roku 2017

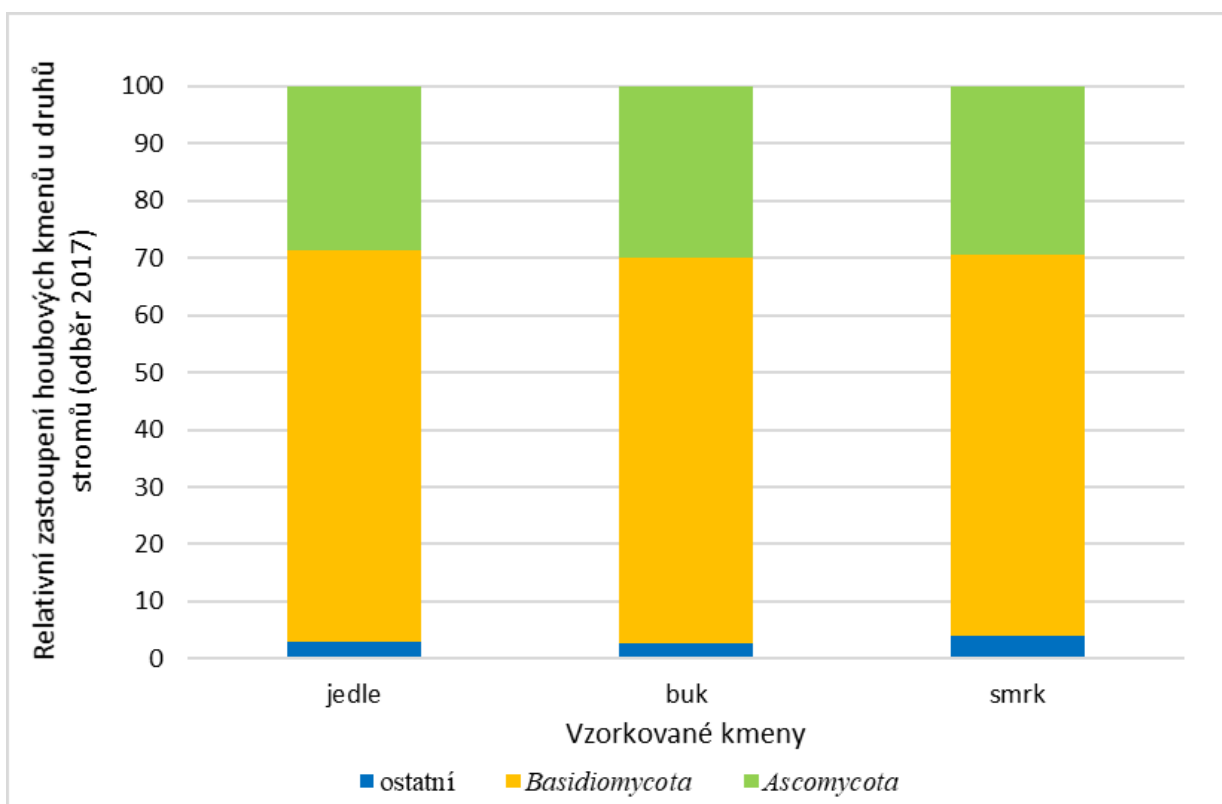
Sekvence mezerníku ITS2 získané pomocí Mi-Seq (2x250bp) byly použity pro popis složení houbového společenstva tří druhů kmenů ve 4 věkových třídách z 2 let odběru. Po odstranění nekvalitních sekvencí vznikl soubor o 116 160 sekvencích max. délky 396 bp a min. délky 40 bp. Sekvence byly zařazeny do 41 884 OTU na 97% úrovni podobnosti (odstranění singletonů, tj. OTU obsahujících pouze 1 sekvenci). Nehoubové sekvence byly odstraněny. Pro nejvíce se vyskytující sekvence byly nalezeny nejbližší identifikované sekvence ve 12 kmenech a 154 řádech. Pro jednotlivé OTU byla určena E-hodnota, podobnost s nalezenou sekvencí a délka alingment.

U jednotlivých druhů stromů a věkových tříd, z odběru z roku 2017, nebyly pozorovány výrazné rozdíly v dominanci jednotlivých kmenů a řádů (u všech výrazně dominovaly kmeny *Basidiomycota* a *Ascomycota* a řády *Hymenochaetales*, *Agaricales*, *Polyporales*).

U odběru z roku 2017 byla zjištěna přítomnost 12 kmenů: *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota*, *Chytridiomycota*, *Basidiobolomycota*, *Glomeromycota*, *Zoopagomycota*, *Neocallimastigomycota* a *Entomophthoromycota*. Ve všech 4 věkových třídách a vzorcích stromů dominovaly s nejvyšším relativním zastoupením 2 kmeny (*Basidiomycota* (67,4%) a *Ascomycota* (29,3%)). K statisticky významnému nárůstu zastoupení basidiomycet došlo dočasně jen ve věkové třídě 20 – 32 let (u těchto kmenů: *Basidiomycota* 77,4%, *Ascomycota* 19,2%, graf 27). Další houbové kmeny byly jen minoritně zastoupené a jsou zahrnuty v grafu 27 jako „ostatní“, dosahovaly pouze 2,8-4 % výskytu. K statisticky významnému nárůstu zastoupení nedošlo u žádného z druhů stromů. Další houbové kmeny byly jen minoritně zastoupené a jsou zahrnuty v grafu 28 jako „ostatní“, dosahovaly pouze 2,8-4 % výskytu.

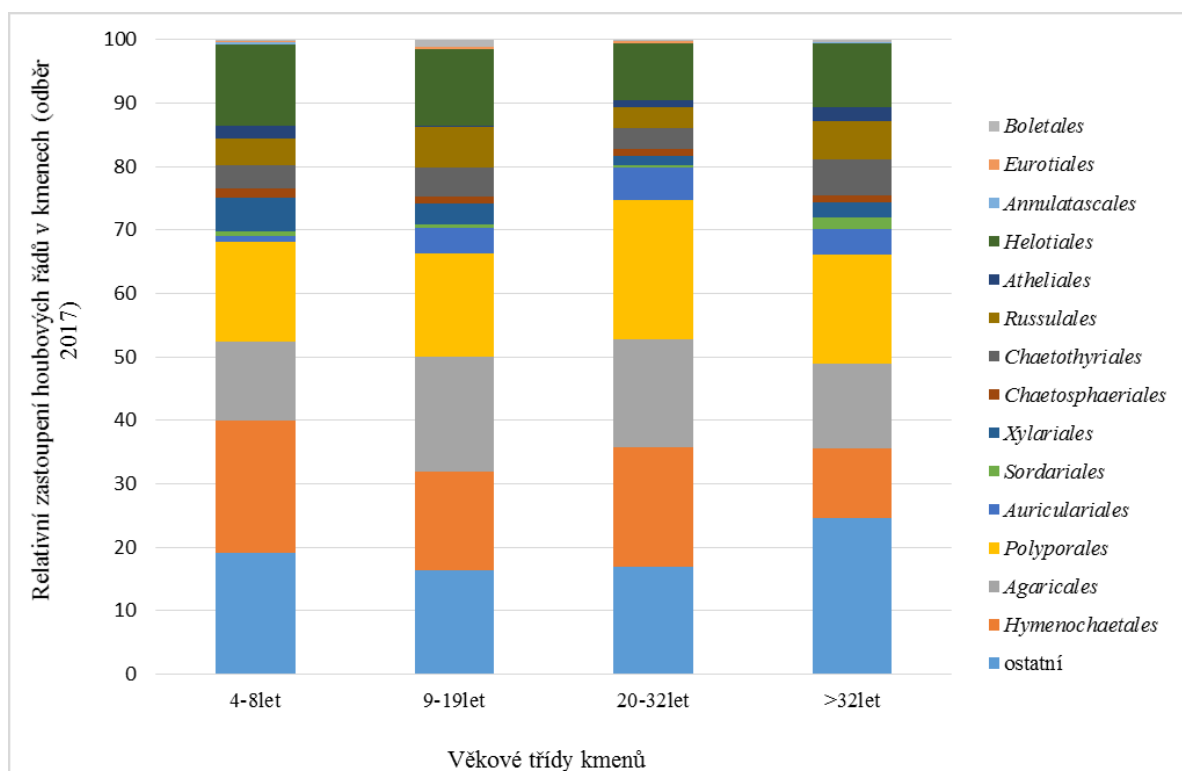


Graf 27 Relativní zastoupení houbových kmenů ve čtyřech věkových třídách v odběru z roku 2017. Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

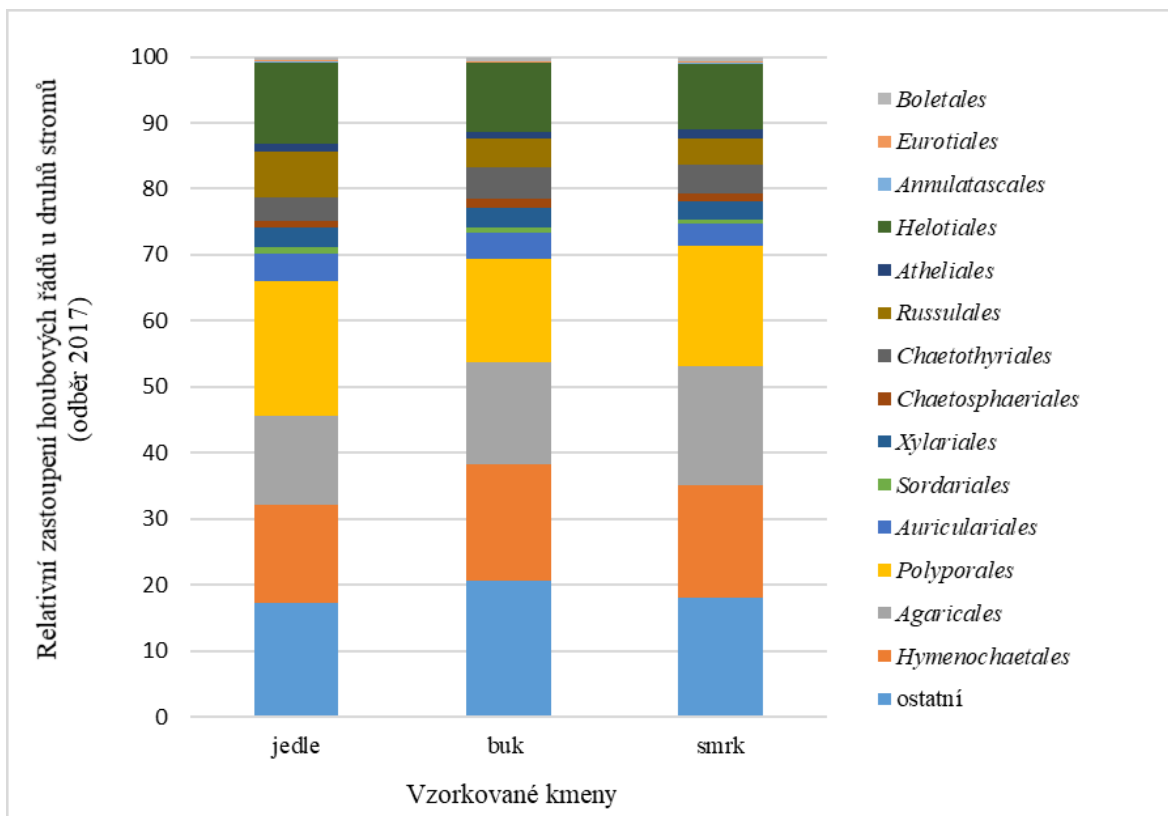


Graf 28 Relativní zastoupení houbových kmenů ve třech druzích stromů v odběru z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

Na úrovni řádů byly nejčastěji detekovány zástupci celkem 8 řádů (graf 30, *Hymenochaetales*, *Agaricales*, *Polyporales*, *Auriculariales*, *Xylariales*, *Chaetothyriales*, *Russulales* a *Helotiales*). Výskyt těchto řádů se mezi věkovými třídami rozkládajících se kmenů v odběru z roku 2017 statisticky nelišil. Minoritně zastoupené řády jsou zobrazeny v grafu 29 jako „ostatní“ (abundance pod 4%, př. *Trechisporales*, *Saccharomycetales*, *Thelephorales*, *Diaporthales*, *Cantharellales*, *Filobasidiales*, *Pezizales*, *Mortierellales*, *Ophiostomatales*, *Thelebolales*, *Hypocreales* a další). Ve všech 3 druhích stromů (jedle, buk a smrk) dominovaly s nejvyšším relativním zastoupením řády *Hymenochaetales* (16,6%), *Agaricales* (15,8%) a *Polyporales* (18,0%), menšími výkyvy v relativním zastoupením (nejnižší bylo u věkové třídy >32let). K statisticky významnému nárůstu zastoupení houbových řádů nedošlo u žádného z druhů stromů, pouze řády *Hymenochaetales*, *Agaricales* mají u jedle o něco nižší zastoupení a řád *Polyporales* vyšší než u buku a smrku. Minoritně zastoupené řády jsou zobrazeny v grafu 30 jako „ostatní“ (abundance pod 4%).



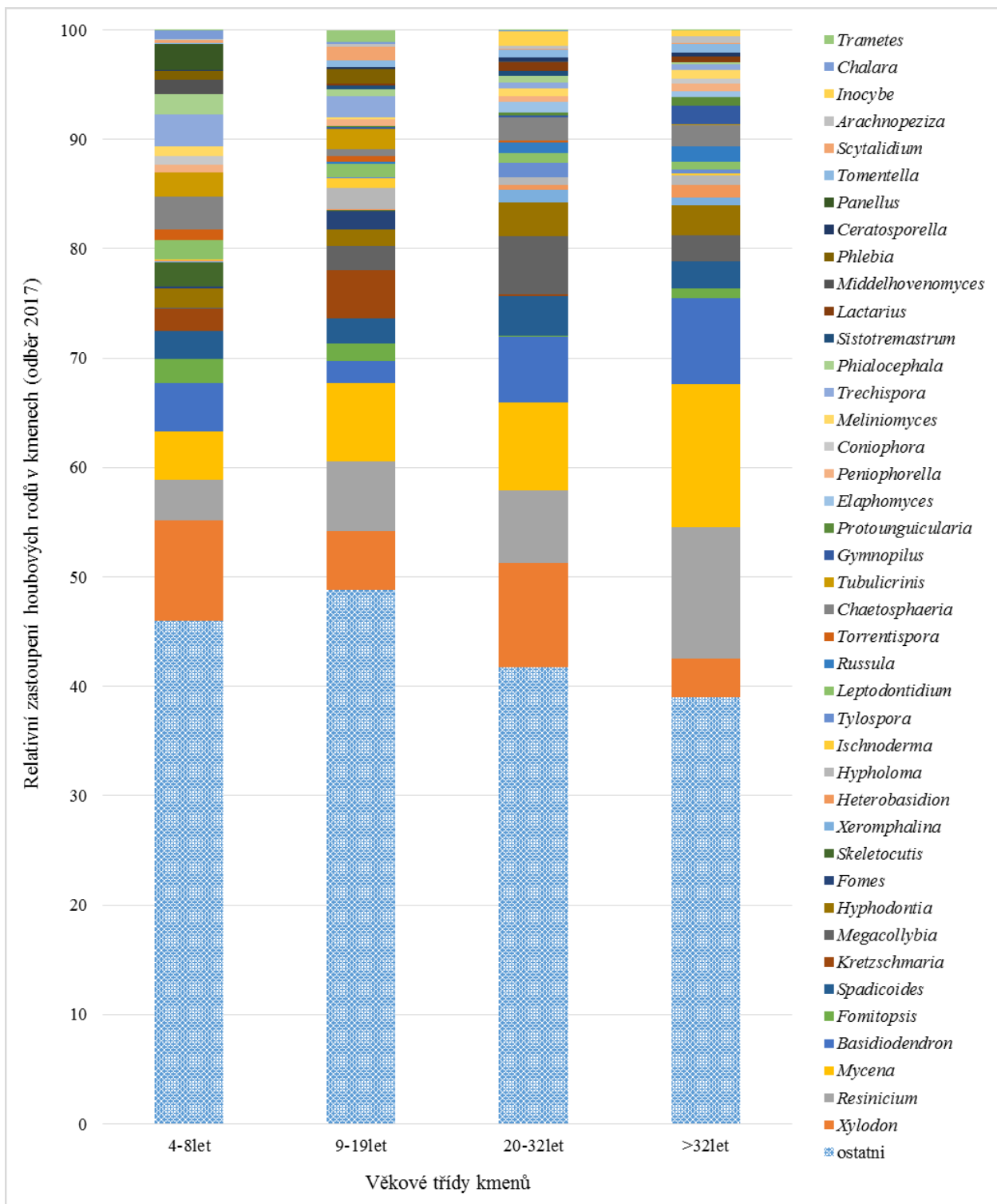
Graf 29 Relativní zastoupení houbových řádů ve čtyřech věkových třídách v odběru z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



Graf 30 Relativní zastoupení houbových řádů ve třech druzích stromů v odběru z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

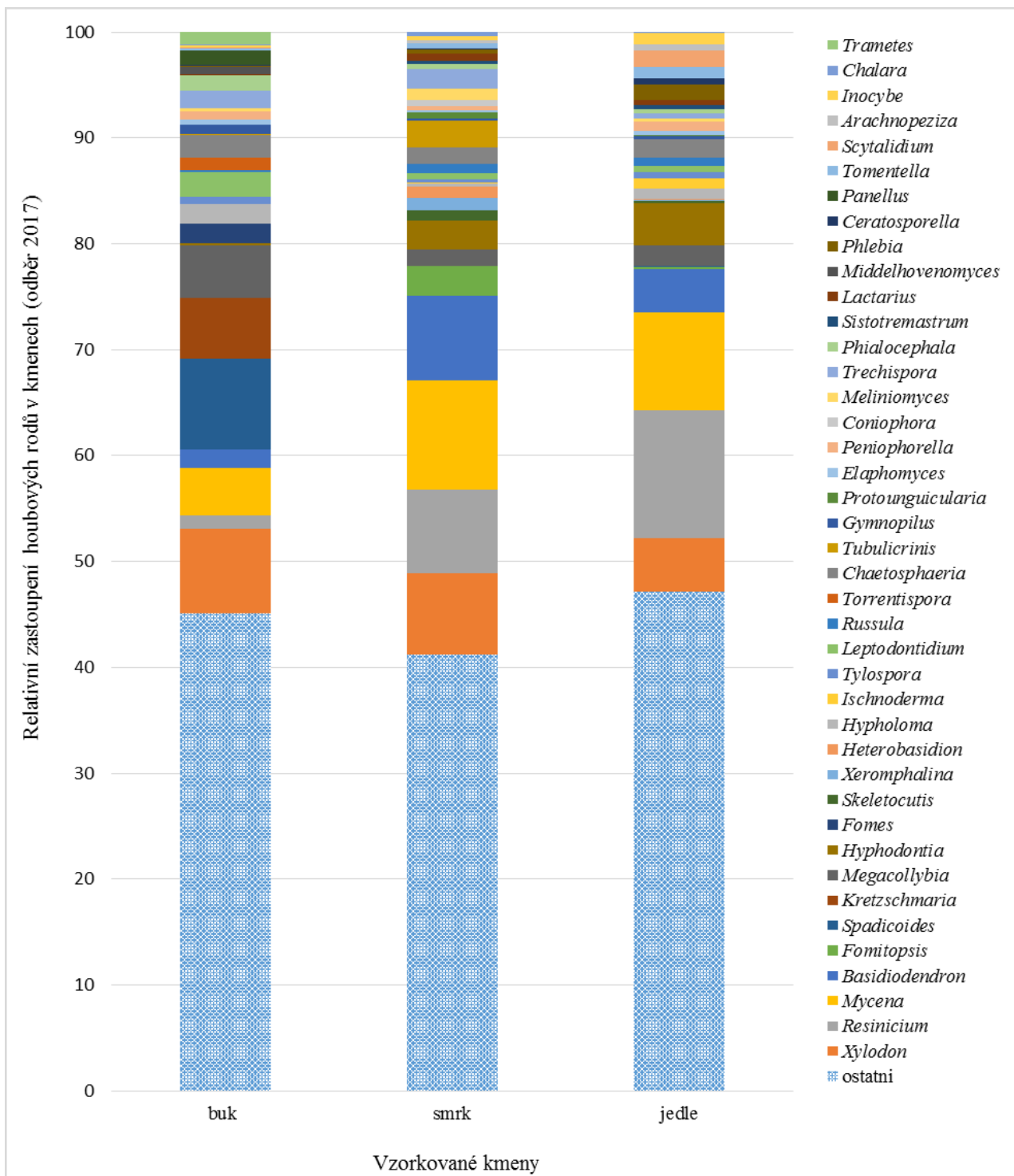
Houbových rodů bylo ve vzorcích dřeva detekováno 1015. 9 houbových rodů bylo dominantních. Byly to rody: *Xylodon* (6,9%), *Resinicium* (7%), *Mycena* (8%), *Basidioidendron* (4,8%), *Fomitopsis* (1,1%), *Spadicoides* (2,7%), *Kretzschmaria* (1,8%), *Megacollybia* (2,7%), *Hyphodontia* (2,7%) a *Fomes* (1,5%). U těchto rodů byly zjištěny statistické rozdíly, jak mezi jednotlivými věkovými třídami, tak mezi jednotlivými druhy stromů. Minoritně zastoupené rody jsou zobrazeny v grafu 31 jako „ostatní“ (abundance pod 1%, př. *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Exidia*, *Athelia*). U rodu *Xylodon* došlo ve věkových třídách k úbytku četnosti (>32let<sup>b</sup>, 20-32let<sup>a</sup>, 9-19let<sup>b</sup> a 4-8let<sup>a</sup>). U rodů *Resinicium*, *Mycena*, *Hyphodontia* a *Spadicoides* došlo ke zvýšení relativní četnosti se zvyšujícím se stupněm rozkladu dřeva. Stejně tak u rodu *Basidioidendron* docházelo ke zvyšování četnosti s menším výkyvem ve věkové třídě 9-19let. Rod *Fomitopsis* naopak úplně chyběl ve věkové třídě 20-32let. Rod *Kretzschmaria* byl detekován pouze ve dvou věkových třídách na počátku rozkladu (9-19let a 4-8let) poté byl nahrazen rodem *Megacollybia* (>32let, 20-32let, 9-19let). Rod *Fomes* byl nalezen pouze v jedné věkové třídě (9-19let). Mezi druhy stromů (buk, smrk, jedle, graf 32) byly detekovány výrazné rozdíly. Rody *Xylodon*, *Resinicium*, *Mycena*, *Basidioidendron*, *Megacollybia* byly naměřené u všech druhů stromů.

Docházelo pouze k menším výkyvům v zastoupení. Zatímco u rodů, *Hyphodontia*, *Fomitopsis*, *Spadicoides*, *Kretzschmaria* a *Fomes* byly zjištěny výrazné změny v zastoupení u jednotlivých druhů, zejména u buku. Pouze u buku se vyskytovaly rody *Spadicoides*, *Kretzschmaria* a *Fomes*. Rod *Hyphodontia*, byl detekován pouze u smrku a jedle a rod *Fomitopsis* byl detekován pouze u smrku.



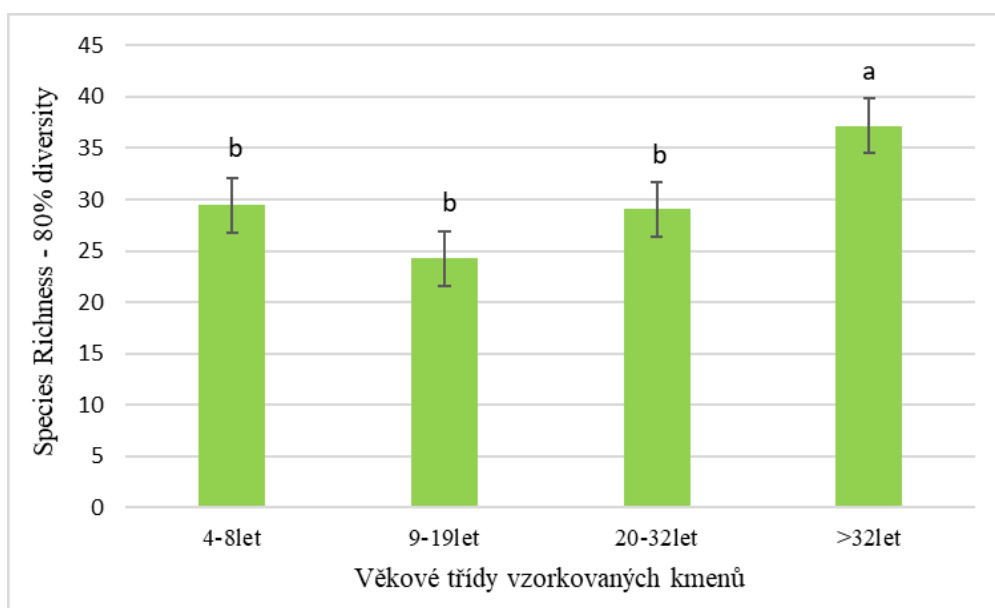
Graf 31 Relativní zastoupení houbových rodů ve čtyřech věkových třídách v odběru z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



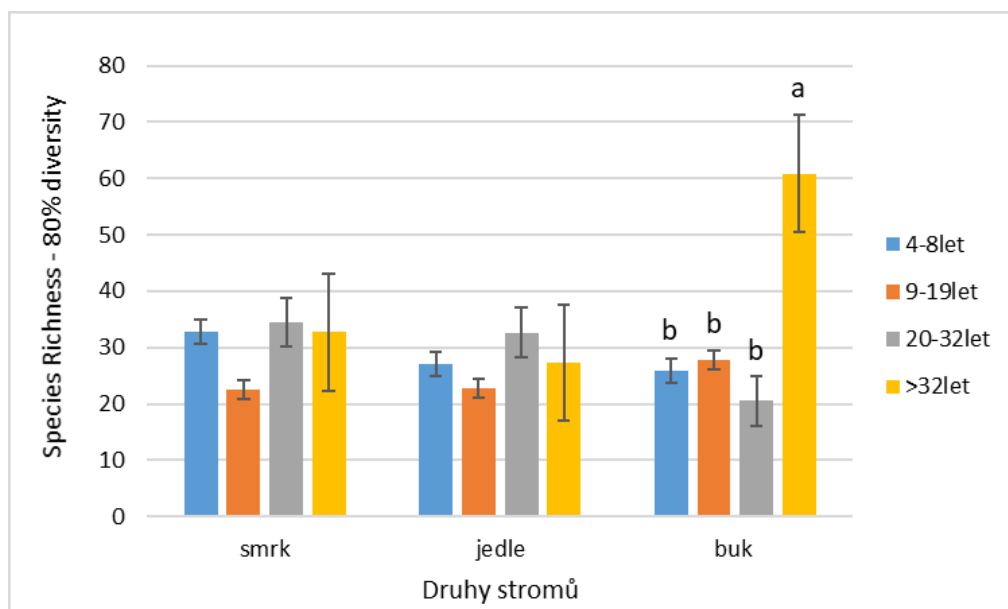


Graf 32 Relativní zastoupení houbových rodů ve třech druzích stromů v odběru z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

Pro jednotlivé věkové třídy (>32let, 20-32let, 9-19let a 4-8let) a druhy stromů (buk, jedle a smrk) z roky odběru 2017, byly stanoveny indexy diversity (graf 33 a 34). Vyrovnanost byla u všech vzorků velmi podobná. Statisticky významný rozdíl v indexu diverzity mezi věkovými třídami v byl detekován pouze ve věkové třídě >32 let (diversita stoupala s více rozloženým dřevem, graf 33) a mezi druhy stromů byl detekován rozdíl u buku (graf 34).



Graf 33 Index druhové bohatosti 80% u odběru z roku 2017 mezi věkovými třídami bez ohledu na druh stromu. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post

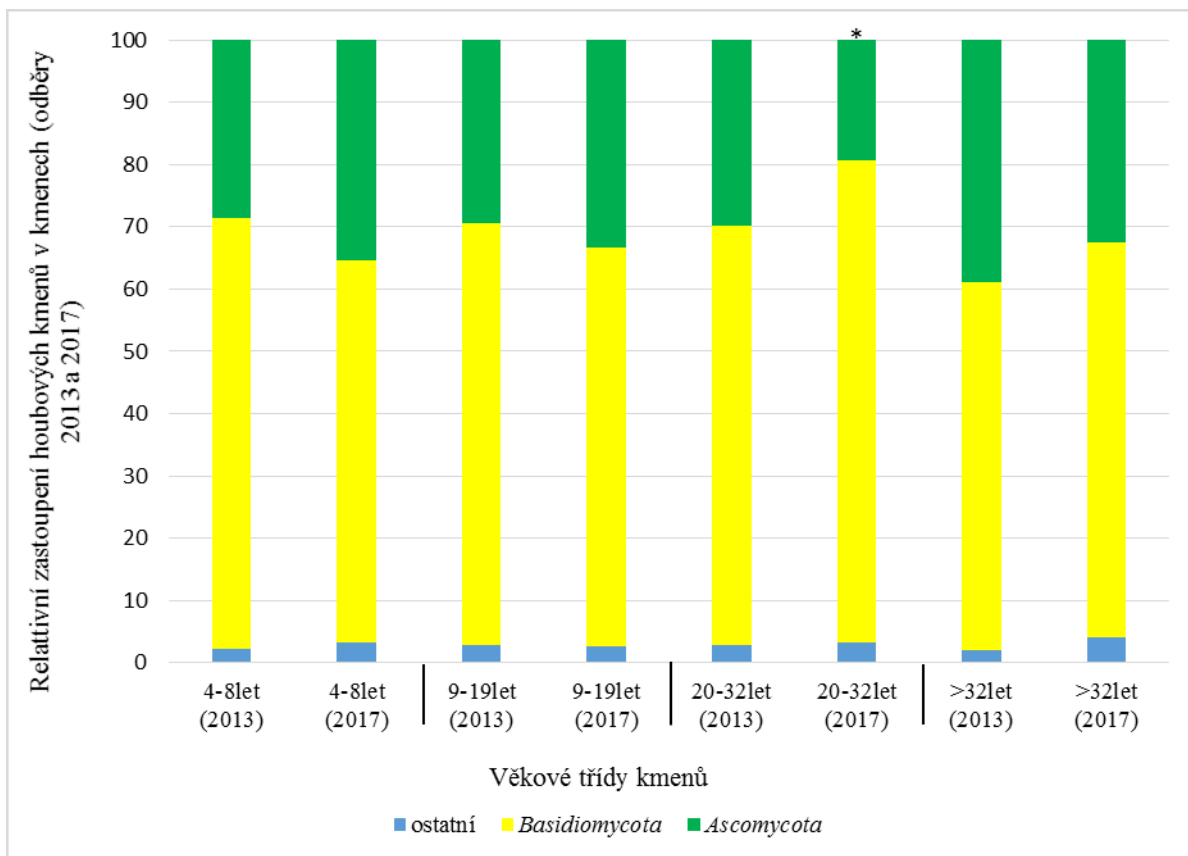


Graf 34 Index druhové bohatosti 80% u odběru z roku 2017 mezi věkovými třídami s ohledem na druh stromu. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post.

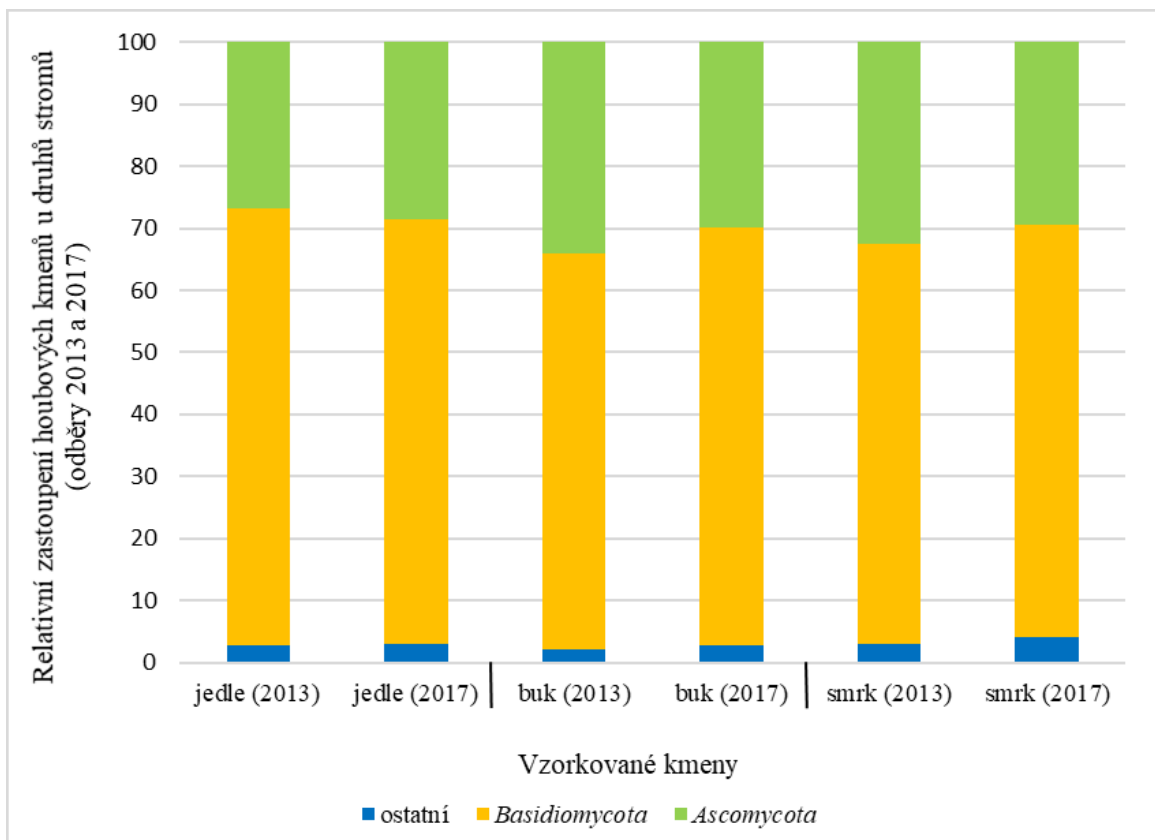
### 5.2.3.2 Srovnání hub v tlejícím dřevě ve dvou odběrech (rok 2017 a 2013)

Ve všech 4 věkových třídách, z obou odběrů (rok 2013 i 2017), dominovaly s nejvyšším relativním zastoupením 2 kmeny. V odběru v roce 2017 (*Basidiomycota* (67,4%) a *Ascomycota* (29,3%)) a v odběru v roce 2013 (*Basidiomycota* (66,1%) a *Ascomycota* (31,3%)). U těchto dvou kmenů byly změřeny statistické rozdíly v rámci obou odběrů ve věkové třídě 20-32let. U ostatních věkových tříd nedocházelo ke změnám. Další kmeny byly u obou odběrů minoritně zastoupené a jsou zahrnuty v grafu 35 jako „ostatní“ (abundance pod 4%, *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota*, *Chytridiomycota*, *Basidiobolomycota*, *Glomeromycota*, *Zoopagomycota*, *Neocallimastigomycota* a *Entomophthoromycota*).

Ve všech 3 druzích stromů (odběry rok 2013 i 2017), dominovaly s nejvyšším relativním zastoupením 2 kmeny. V odběru v roce 2017 (*Basidiomycota* (67,4%) a *Ascomycota* (29,3%)) a v odběru v roce 2013 (*Basidiomycota* (66,1%) a *Ascomycota* (31,3%)). U těchto dvou kmenů nebyly změřeny statistické rozdíly v rámci obou odběrů ani u jednotlivých odběrů v rámci druhů stromů. Další kmeny byly u obou odběrů minoritně zastoupené a jsou zahrnuty v grafu 36 jako „ostatní“ (abundance pod 4%).



Graf 35 Porovnání relativního zastoupení houbových kmenů ve čtyřech věkových třídách v odběru z roku 2013 a z roku 2017. Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



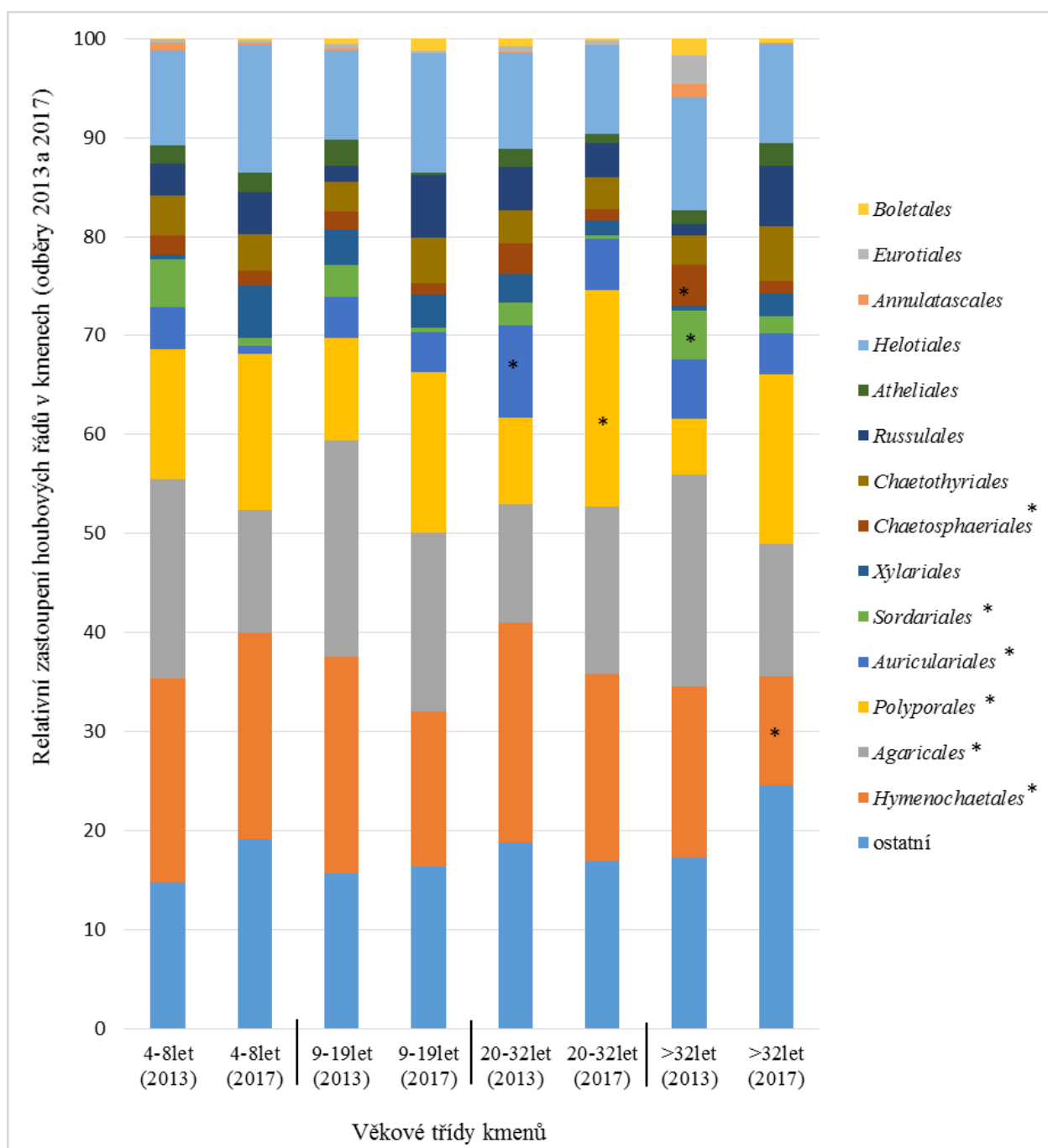
Graf 36 Porovnání relativního zastoupení houbových kmenů ve třech druzích stromů v odběru z roku 2013 a z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

Celkem bylo u odběrů z let 2013 a 2017 detekováno 154 houbových řádů (graf 37). U 11 řádů s nejvyšším relativním zastoupením (*Hymenochaetales*, *Agaricales*, *Polyporales*, *Auriculariales*, *Xylariales*, *Chaetothyriales*, *Russulales* a *Helotiales*), byly zjištěny statisticky významné rozdíly v jejich relativních četnostech mezi jednotlivými věkovými třídami. Minoritně zastoupené řády jsou zobrazeny v grafu 37 jako „ostatní“ (abundance pod 4%).

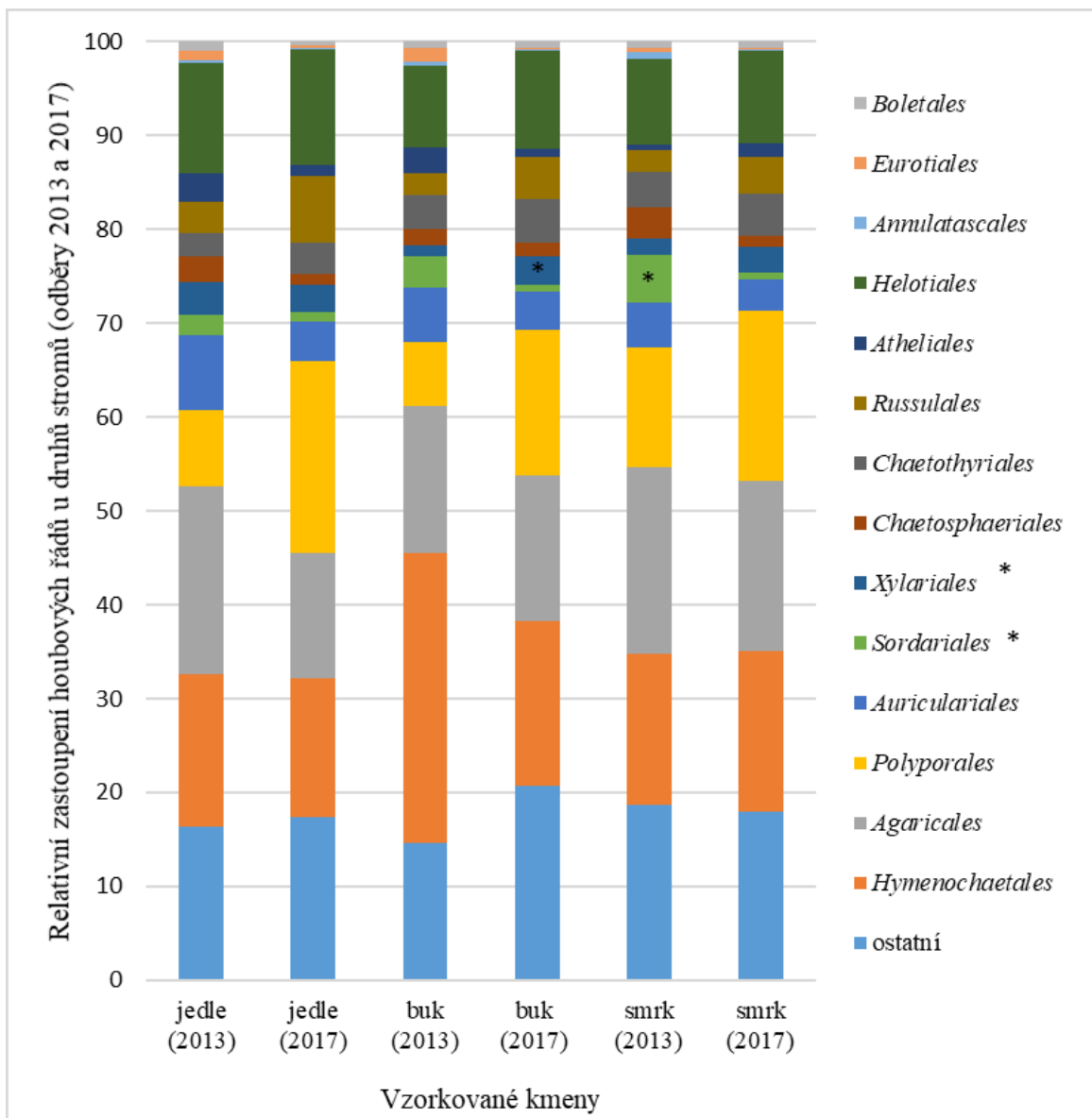
Mezi věkovými třídami, z odběru z roku 2017, nebyly zjištěny statistické rozdíly mezi řády. U odběru z roku 2013 byly zjištěny statistické rozdíly pouze u řádů *Auriculariales*, kde došlo k nárůstu jeho relativní četnosti ve věkové třídě 20-32 let ( $>32\text{let}^{\text{ab}}$ ,  $20-32\text{let}^{\text{a}}$ ,  $9-19\text{let}^{\text{b}}$  a  $4-8\text{let}^{\text{ab}}$ ).

Mezi dvěma odběry byly zjištěny statistické rozdíly u řádu *Polyporales* rok 2013 ( $>32\text{let}^{\text{b}}$ ,  $20-32\text{let}^{\text{a}}$ ,  $9-19\text{let}^{\text{b}}$  a  $4-8\text{let}^{\text{ab}}$ ) a rok 2017 ( $>32\text{let}^{\text{ab}}$ ,  $20-32\text{let}^{\text{a}}$ ,  $9-19\text{let}^{\text{ab}}$  a  $4-8\text{let}^{\text{ab}}$ ), kde došlo k nárůstu jeho relativní četnosti ve věkové třídě 20-32 let. U ostatních řádů s nejvyšším relativním zastoupením nebyly zjištěny statistické rozdíly: *Hymenochaetales*, *Agaricales*, *Auriculariales*, *Xylariales*, *Chaetothyriales*, *Russulales* a *Helotiales*.

Mezi druhy stromů u obou odběrů (rok 2013 a 2017) byly zjištěny statistické rozdíly mezi řády (graf 38). Statistické rozdíly, mezi dvěma odběry, byly detekovány pouze u dvou řádů. U řádu *Sordariales*, rok 2013 (smrk<sup>a</sup>, buk<sup>ab</sup> a jedle<sup>ab</sup>) a rok 2017 (smrk<sup>b</sup>, buk<sup>ab</sup> a jedle<sup>ab</sup>), došlo k nárůstu jeho relativní četnosti u smrku v roce odběru 2013. U řádu *Xylariales* rok 2013 (smrk<sup>b</sup>, buk<sup>b</sup> a jedle<sup>ab</sup>) a rok 2017 (smrk<sup>ab</sup>, buk<sup>a</sup> a jedle<sup>ab</sup>), došlo k nárůstu jeho relativní četnosti u buku v roce odběru 2017.



Graf 37 Porovnání relativního zastoupení houbových řádů ve čtyřech věkových třídách v odběru z roku 2013 a z roku 2017. Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

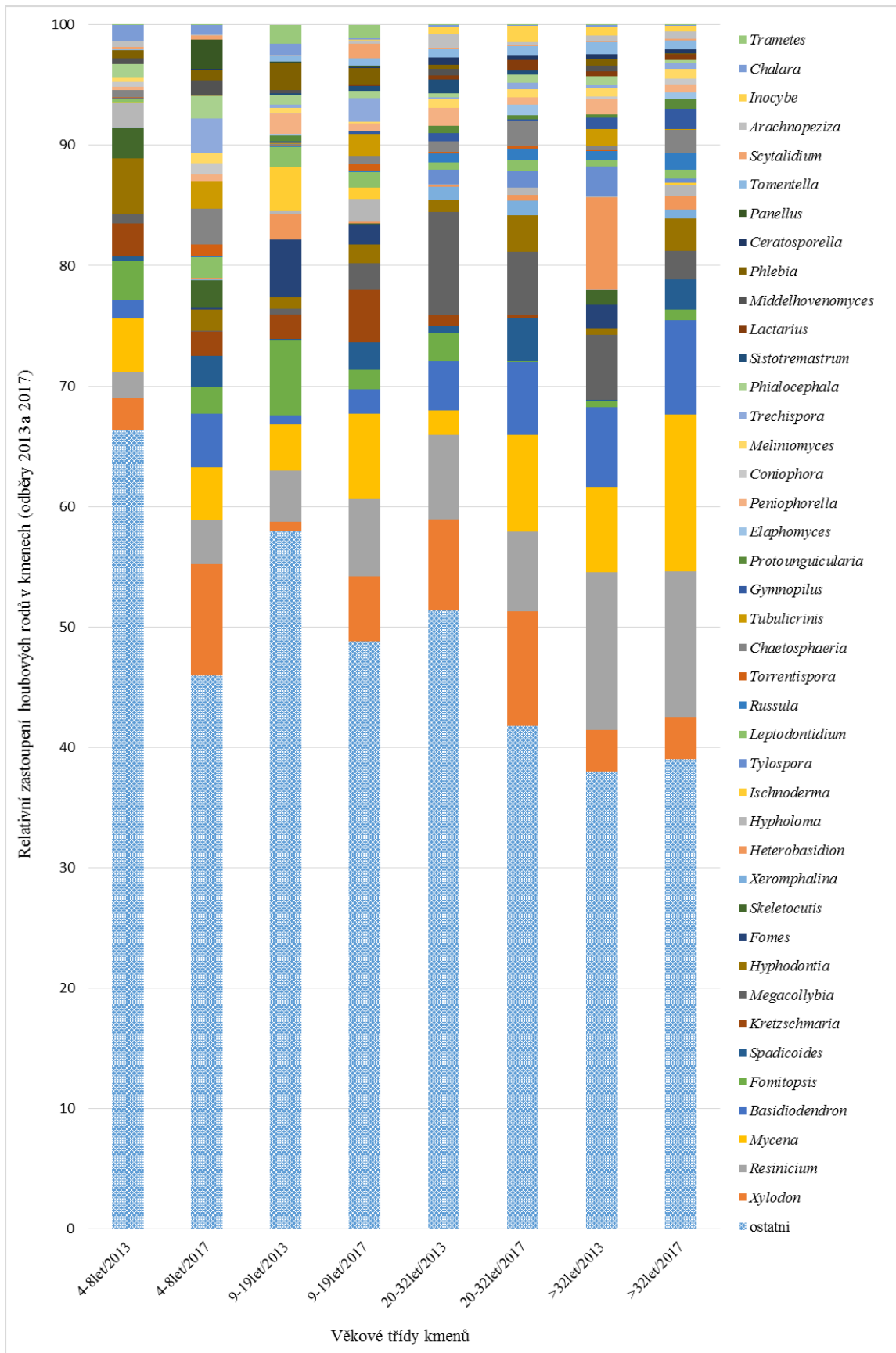


Graf 38 Porovnání relativního zastoupení houbových řádů ve třech druzích stromů v odběru z roku 2013 a z roku 2017. Statistické rozdíly (\*) byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

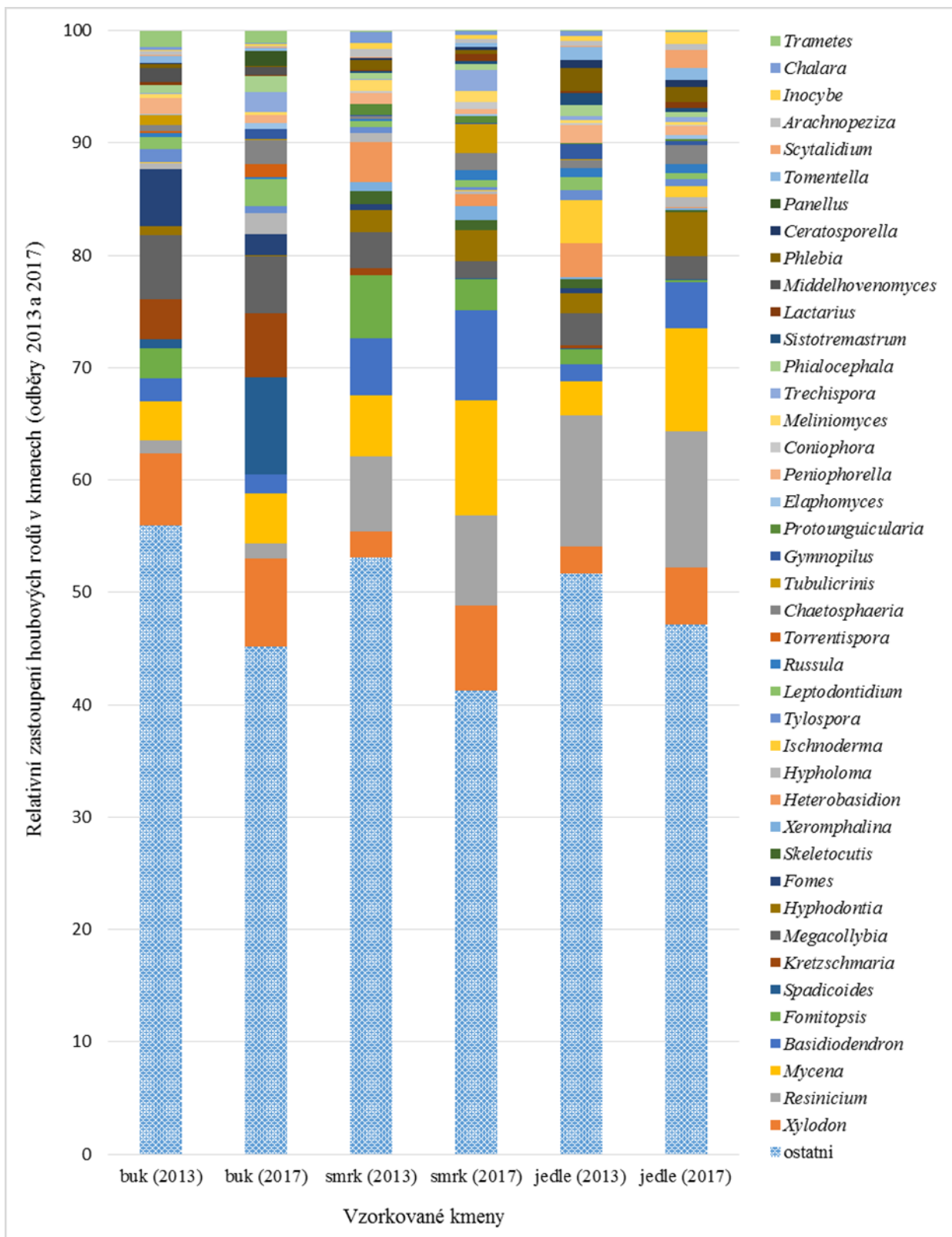
Mezi dvěma odběry (rok 2013 a 2017) docházelo k výrazným změnám v relativním zastoupení jednotlivých houbových rodů. Statistické rozdíly byly měřeny u dominantních rodů: *Xylodon*, *Resinicium*, *Mycena*, *Basidiodendron*, *Fomitopsis*, *Spadicoides*, *Kretzschmaria*, *Megacollybia*, *Hyphodontia* a *Fomes*. Minoritně zastoupené rody jsou zobrazeny v grafu 39 jako „ostatní“ (abundance pod 1%, př. *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Exidia*, *Athelia*). Rody *Xylodon* (6,9%), *Resinicium* (7%), *Mycena* (8%), *Basidiodendron* (4,8%), *Spadicoides* (2,7%), *Kretzschmaria* (1,8%) a *Hyphodontia* (2,7%) byly naměřeny vyšší v roce odběru 2017 ve všech věkových třídách (rok 2013 *Xylodon* (3,6%), *Resinicium* (6,4%), *Mycena* (4,1%), *Basidiodendron* (3,3%), *Spadicoides* (0,2%), *Kretzschmaria* (1,4%) a *Hyphodontia*

(1,5%). Zatímco u rodů *Fomitopsis* (3,4%), *Megacollybia* (3,8%) a *Fomes* (1,9%) došlo ke snížení relativní četnosti v roce odběru 2017 (*Fomitopsis* (1,1%), *Megacollybia* (2,7%), a *Fomes* (1,5%). Mezi druhy stromů (buk, smrk, jedle, graf 40) byly detekovány výrazné rozdíly. Rody *Xylodon*, *Resinicium*, *Mycena*, *Basidiodendron*, byly naměřené u všech druhů stromů, s tím, že docházelo ke zvyšování relativní četnosti v roce odběru 2017. Zatímco rody *Fomitopsis*, *Spadicoides*, *Kretzschmaria*, *Megacollybia*, *Hyphodontia* a *Fomes*, chyběly vždy aspoň u jednoho druhu stromu. Rody *Fomitopsis* a *Hyphodontia* zcela chyběly u buku, zatímco rody *Spadicoides*, *Kretzschmaria*, *Megacollybia*, a *Fomes* se vyskytovaly pouze u buku s minimálním zastoupením u smrku a jedle.



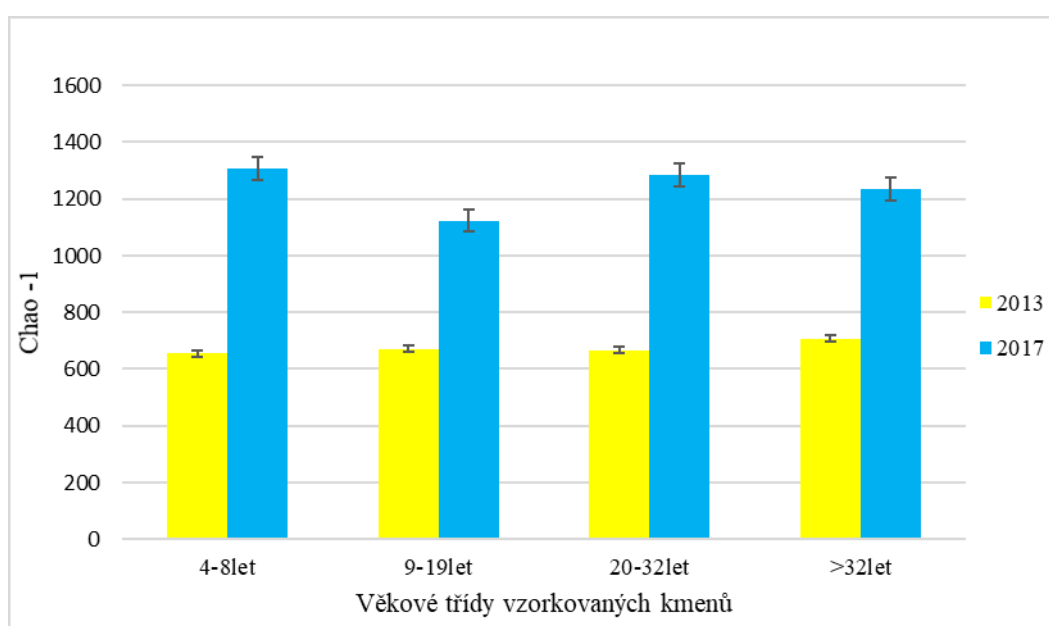


Graf 39 Porovnání relativního zastoupení houbových rodů ve čtyřech věkových třídách v odběru z roku 2013 a z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

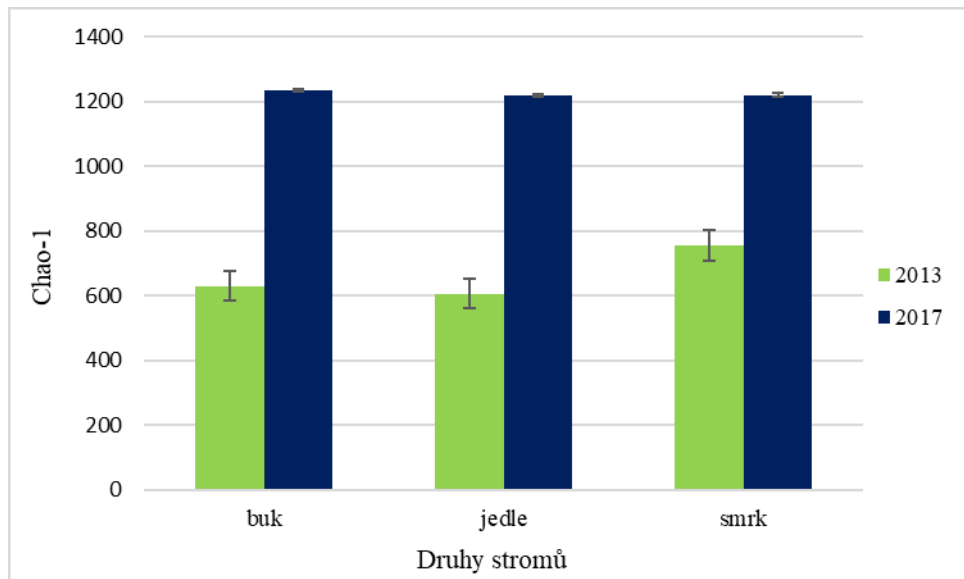


Graf 40 Porovnání relativního zastoupení houbových rodů ve třech druzích stromů v odběru z roku 2013 a z roku 2017. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

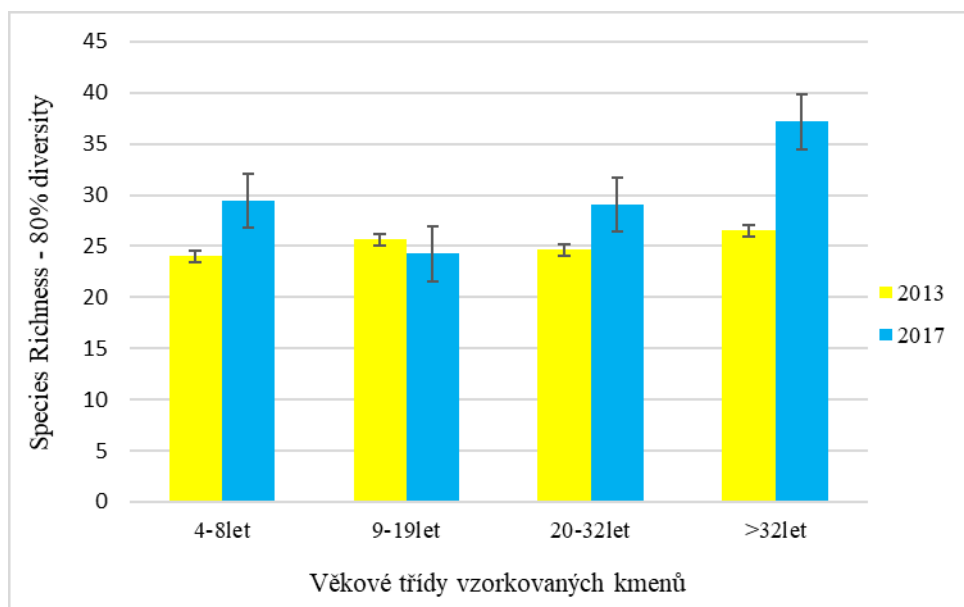
Index Chao-1 (graf 41 a 42) se porovnával mezi dvěma odběry (rok 2013 a 2017). Oba roky odběru se významně lišily. Vysoké rozdíly u celkové diverzity (Chao-1) indikují, že hloubka sekvenace z odběru roku 2013 nepostihla dostatečně všechny OTU (druhy), které se ve vzorku vyskytovaly. Index diversity 80% (graf 43 a 44) byl mezi jednotlivými odběry (rok 2013 a 2017) významně odlišný. Celkově byl index diversity 80% vyšší pro rok odběru 2017. Statisticky významný rozdíl v indexu diversity mezi věkovými třídami byl detekován pouze u věkové třídy >32let/2017 (v rámci jednoho roku odběru (graf 43)). Mezi jednotlivými druhy stromů byl detekován výrazný statistický rozdíl u jedle (nižší u roku odběru 2013, graf 44).



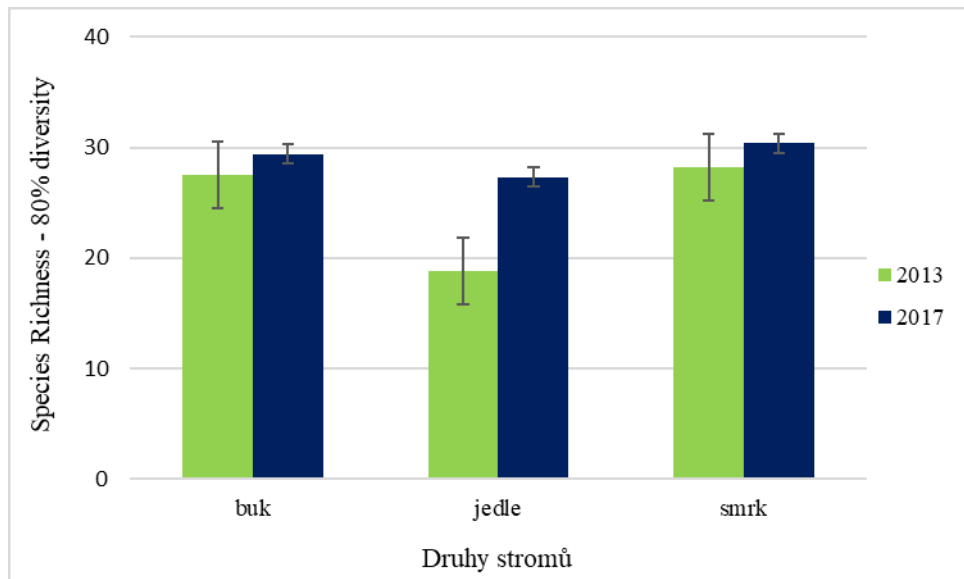
Graf 41 Porovnání dvou roků odběru (2013a 2017) Chao-1 indexu houbových společenstev v tlejícím dřevě. Rozdíly mezi jednotlivými věkovými třídami. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ). V grafu jsou uvedeny průměry a střední chyby průměru.



Graf 42 Porovnání dvou roků odběru (2013 a 2017) Chao-1 indexu houbových společenstev v tlejícím dřevě. Rozdíly mezi jednotlivými druhy stromů. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ). V grafu jsou uvedeny průměry a střední chyby průměru.



Graf 43 Index druhové bohatosti 80% u dvou odběrů z roku 2013 a 2017. Rozdíly mezi jednotlivými věkovými třídami bez ohledu na druh stromu. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post. V grafu jsou uvedeny průměry a střední chyby průměru.



Graf 44 Index druhové bohatosti 80% u dvou odběrů z roku 2013 a 2017. Rozdíly mezi jednotlivými druhy stromů. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ). V grafu jsou uvedeny průměry a střední chyby průměru.

### 5.2.3.3 Funkční struktura houbového společenstva v tlejícím dřevě

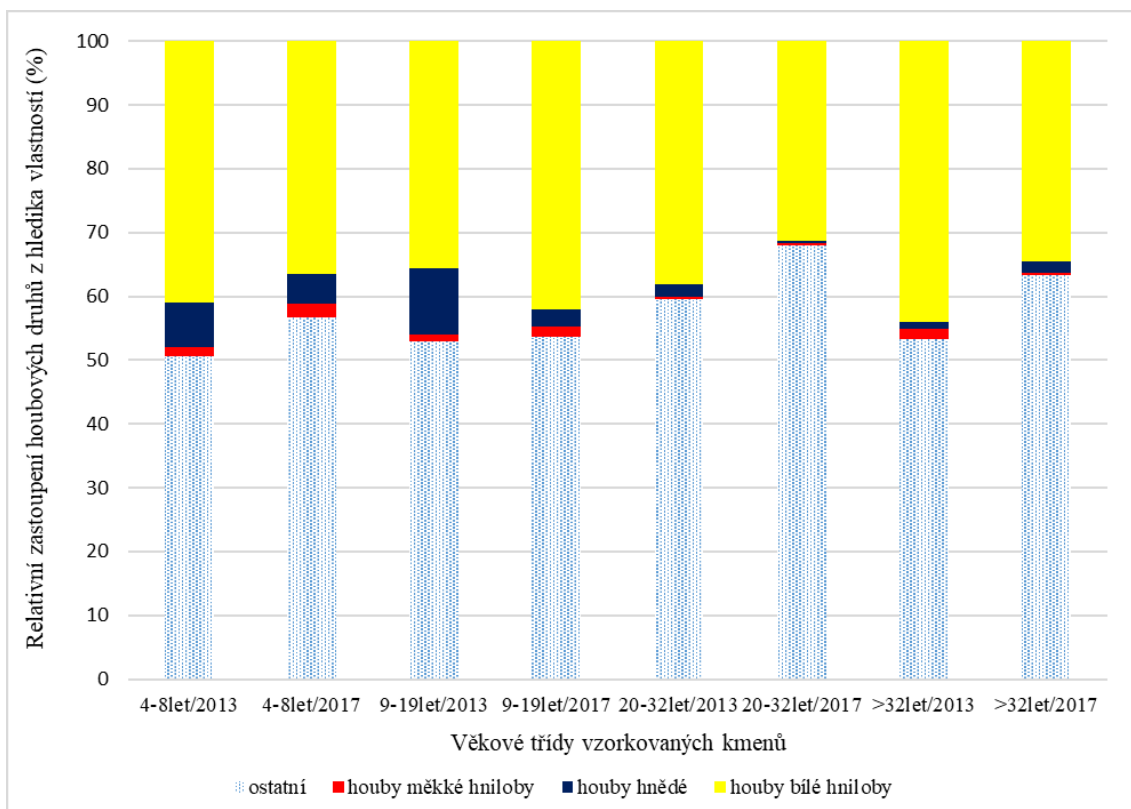
Na grafech 45 a 46 jsou statistické rozdíly v rámci životní strategie a v rámci degradačních skupin u dřevokazných hub.

Na grafu 45 výrazněji převažují saprotrofní organismy (60-71%) u všech stromů ve všech věkových třídách. Rozdíly byly zjištěny mezi roky odběrů i věkovými třídami jednoho roku odběru. Statistický rozdíl byl také zjištěn u symbiotrofů (5-15%) jak mezi dvěma roky odběru (2013 i 2017), tak mezi jednotlivými věkovými třídami v rámci jednoho roku odběru. Mezi „ostatní“ byly zařazeny houby s kombinací životní strategie př. saprotrof-symbiotrof (abundance pod 2%).

Na grafech 46 jsou viditelné rozdíly mezi jednotlivými skupinami hub v rámci degradačních vlastností. Celkově bylo u všech stromů ve všech věkových třídách u obou dvou odběrů (2013 a 2017) zaznamenáno několikanásobně vyšší množství hub bílé hniloby (rozkládající mimo jiné lignin, 31-44%). Statistické rozdíly byly naměřeny jak mezi dvěma odběry, tak mezi jednotlivými třídami v rámci jednoho roku odběru. Statistické rozdíly byly také naměřené u hub hnědé hniloby (2-10%) mezi věkovými třídami i dvěma roky odběru (nejvyšší relativní zastoupení hub hnědé hniloby bylo ve věkové třídě 9-19let/2013). Houby hnědé hniloby byly nejvíce zastoupeny v počátečních fázích rozkladu dřeva. Třetí významná skupina hub zapojená do degradace dřeva, houby měkké hniloby (2%), byly zastoupeny málo. Byly detekovány jak v počátečním fázích, tak v pozdějších fázích rozkladu dřeva. Nejvyšší relativní zastoupení hub měkké hniloby bylo ve věkových třídách 4-8let a 9-19 let v roce odběru 2017. Mezi „ostatní“ (abundance pod 1%) byly zařazeny především houby u nichž nejsou degradačních vlastností zcela objasněny. Ektomykorhizní houby nebyly zastoupeny.



Graf 45 Relativní zastoupení hub podle životní strategie u dvou odběrů z roku 2013 a 2017 bez ohledu na druh stromu. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).



Graf 46 Relativní zastoupení houbových rodů z hlediska vlastností u dvou odběrů z roku 2013 a 2017 bez ohledu na druh stromu. Statistické rozdíly byly vypočítány metodou Fisherův LSD post-hoc test ( $p < 0,05$ ).

## 6 Diskuze

### 6.1 Struktura mikrobiálního společenstva na vybraných kmenech v oblasti Národní přírodní rezervace Žofinský prales

Význam tlejícího dřeva (různých druhů stromů) spočívá v koloběhu živin (př. C, N), tvorbě humusu a půdy a ukládání uhlíku, byl již zmiňován v dřívějších studiích (Liu et al., 2013). Studie (Baldrian et al., 2016) na vybraných kmenech (buk, smrk, jedle) v Žofinském pralese potvrdila, že tlející dřevo představuje významné stanoviště pro širokou škálu mikroorganismů (hub, bakterií atd.). V této práci byla zjišťována diverzita mikrobiálního společenstva z hlediska dřevokazných hub s důrazem na vývoj v čase. Dřevokazné houby (obecně houbová společenstva) jsou díky vláknitému růstu a schopnosti rozkládat nepropustné polymery, extracelulárními enzymy, efektivními kolonizátory nejen dřevní hmoty (Rajala et al., 2011; Van Der Wal et al., 2007).

Z dřevokazných hub byly na rozkladu dřevní hmoty nejčastěji detekovány zástupci dvou kmenů *Basidiomycota* (67,4%) a *Ascomycota* (29,3%), stejně jako v předchozí studii (Baldrian et al., 2016). Zástupci kmene *Ascomycota* patří k houbám měkké i bílé hniloby. Nalezneme je jak v počátečních fázích rozkladu dřeva (tzv. primární kolonizátoři) tak v pokročilých fázích. Mezi zástupce kmene *Basidiomycota* patří především houby hnědé hniloby (Rayner a Boddy, 1988; Boddy, 2000). Zástupci kmene *Basidiomycota* převažovali relativním zastoupením kmene *Ascomycota*. Proces rozkladu je přednostně řízen *Basidiomycoty*, protože jejich enzymatický komplex nejlépe konkuruje ostatním mikroorganismům, i přes slabší ligninolytickou aktivitou (Bani et al., 2018). Dominantními houbovými třídami byly *Basidiomycetes* a *Ascomycetes*. Oba kmene a obě třídy byly zastoupeny po celou dobu rozkladu dřevní hmoty ve všech druzích stromů (buk, smrk i jedle). V průběhu rozkladu došlo k zvýšení relativního zastoupení *Basidiomycota* ve věkové třídě 20-32let, nárůst mohl být zapříčiněn nárůstem řádu *Polyporales*.

Kmeny *Basidiomycota* a *Ascomycota* hrají podstatnou roli i při degradaci jiných substrátů jako je rostlinný opad a houbové mycelium (Osono, 2020; Bani et al., 2018). Podle studií (Bani et al., 2018; Schneider et al., 2012) bylo zjištěno, že *Ascomycota* jsou považovány za první kolonizátory mrtvého dřeva a rostlinného opadu (jsou zapojeny hlavně do rozkladu celulózy) a *Basidiomycota* se objevují pozdějších fázích rozkladu (degradace především ligninu). Výsledky této práce



částečně potvrzují přítomnost zástupců kmene *Ascomycota* v počátečních fázích rozkladu se snižováním relativního zastoupení na úkor zástupců kmene *Basidiomycota* v pozdějších fázích rozkladu dřeva. Zároveň ve studii (Schneider et al., 2012), která využívala metaproteomiku k propojení množství a aktivity enzymů s jejich fylogenetickým původem a ke zkoumání vlivu faktorů prostředí a živin na strukturu a funkci dekompozitorů během rozkladu rostlinného (bukového) opadu, byla detekována dominance (> 80%) kmenů *Ascomycota* a *Basidiomycota* a to ve všech lokalitách a časech. Podíl kmene *Basidiomycota* se mírně zvýšil v průběhu rozkladu. Přítomnost obou kmenů byla patrná i po celou dobu rozkladu dřeva. Kromě již zmíněných dominantních kmenů se podílejí na rozkladu dřeva, ale i jiných substrátů (rostlinný opad), další minoritní zástupci: *Mortierellomycota*, *Mucoromycota*, *Olpidiomycota*, *Rozellomycota*, *Chytridiomycota*, *Basidiobolomycota*, *Glomeromycota*, *Zoopagomycota*, *Neocallimastigomycota* a *Entomophthoromycota*. Kmen *Mucorycota* byl detekován i v rozkladu rostlinného (bukového) opadu, kde jeho abundance s délkou rozkladu klesala (Schneider et al., 2012). Dominance zmíněných kmenů byla potvrzena i ve studii (Vořískova a Baldrian, 2013) v listovém opadu (dubu), kde byla většina houbových sekvencí přiřazena ke kmenům *Ascomycota* (71%) a *Basidiomycota* (26%). *Ascomycota* převážovaly v počátečních a konečných fázích rozkladu listů a *Basidiomycota* ve středních fázích rozkladu, kde představovaly 60% amplikonů. Kmeny *Glomeromycota* (1,8%) a *Mucoromycotina* (0,76%) byly v rozkladu listů zastoupeny pouze minoritně, stejně jako u rozkladu dřeva (2,8-4%).

Na nižší taxonomické úrovni byly v degradovaném dřevě detekovány s nejvyšším relativním zastoupením řády: *Hymenochaetales* (16,6%), *Agaricales* (15,8%) a *Polyporales* (18,0%), *Auriculariales* (4,8%), *Xylariales* (3%), *Chaetothyriales* (4,2%), *Russulales* (5%) a *Helotiales* (10,8%). Tyto řády byly popsány také při degradaci rostlinného opadu a houbového mycelia (Brabcová et al., 2018; Osono, 2020). Pro degradaci substrátů (tlející dřevo nebo rostlinný opad) využívají podobnou škálu extracelulárních enzymů. U listového opadu (dubu) byly nejhojněji zastoupeny houbové řády *Capnodiales* (22% sekvencí), *Helotiales* (20%) a *Tremellales* (12%), zatímco na degradaci dřeva se řády *Capnodiales* a *Tremellales* podílely pouze minoritně. Naopak dominantní houbový řád (*Helotiales* (10,8%)), byl detekován, jak v rozkládajícím se dřevě, tak i v listovém (dubovém) opadu (Vořískova and Baldrian, 2013). V další studii (Brabcová et al., 2016), která se zabývala

rozkladem houbového mycelia *Tylopilus felleus* v opadu a lesní půdě, byla detekována přítomnost také několika řádů. V lesní půdě převažovaly řády *Eurotiales*, *Russulales* a *Helotiales*, zatímco v opadu převažovaly řády *Helotiales*, *Corticiales* a *Agaricales*. Tyto řády (*Russulales*, *Helotiales* a *Agaricales*) byly potvrzeny i jako dominantní dekompozitoři mrtvého dřeva v naší studii. U rozkladu rostlinného opadu v podobě jehličí *Picea abies* ve studii (Žifčáková et al., 2011) byly potvrzeny řády *Helotiales* (z kmene *Ascomycota*) a řády *Polyporales*, *Agaricales* a *Russulales* (z kmene *Basidiomycota*).

Na úrovni houbových rodů byly na vzorcích dřeva nalezeny nejčastěji zástupci rodů: *Xylodon* (6,9%), *Resinicium* (7%), *Mycena* (8%), *Basidioidendron* (4,8%), *Fomitopsis* (1,1%), *Spadicoides* (2,7%), *Kretzschmaria* (1,8%), *Megacollybia* (2,7%), *Hyphodontia* (2,7%) a *Fomes* (1,5%). Některé z těchto rodů byly v podobě plodnic na tlejících kmenech v další části experimentu identifikovány, izolovány a popsány z hlediska chemismu a aktivity degradačních enzymů (př. *Fomes*, *Kretzschmaria* a *Fomitopsis*). Zástupci rodu *Fomitopsis* a *Mycena* byly také zapojeny do degradace rostlinného opadu, jehličí *Picea abies* (Žifčáková et al., 2011).

Vlastnosti dřevokazných hub, které nejvíce určují rychlost a kinetiku rozkladu dřevní hmoty byly v současnosti analyzovány ve studii (Lustenhouwer et al., 2020). V 5-leté studii na 34 saprotrofických houbách ze Severní Ameriky zahrnující 1 582 hub izolovaných ze 74 dekompozičních kmenů, bylo pozorováno, že nejvíce rychlost rozkladu ovlivňuje schopnost efektivního růstu hyf (hyfální růst), na místo hustoty hyf. Naopak produkce hydrolytických extracelulárních enzymů, které uvolňují nutrienty z rozpadajícího se organického materiálu (kyselá fosfatáza, chitináza,  $\beta$ -glukosidáza), byla na úkor rychlejšího rozkladu. Dominantní kmeny, řády a rody nalezené, jak v naší studii na dřevě, tak ve studiích na rozkladu ostatních habitatů, poukazují na to, že tyto houby jsou schopné konkurovat a efektivněji degradovat organickou hmotu př. rychlejším hyfálním růstem, větším zastoupením enzymů rozkládajícím dostupné zdroje C nebo odolností růst v široké škále abiotických faktorů. Jsou tedy důležitými dekompozitory organické hmoty.

## 6.2 Fyzikálně chemické vlastnosti rozkládaného dřeva

Mikrobiální společenstvo (houbového společenstvo) je ovlivňováno změnami biochemických vlastností tlejícího dřeva. Z předchozí studie (Baldrian et al., 2016) rozkladu dřeva v oblasti Žofínského pralesa vyplývá, že složení houbového společenstva je ovlivňováno délkou rozkladu dřeva – fází rozkladu, koncentrací dusíku a pH. V průběhu dekompozice dřeva dochází ke změnám ve složení houbového společenstva a ke změnám fyzikálně-chemických vlastností: změna pH a obsahu uhlíku, dusíku a fosforu (Boddy a Hiscox, 2017). Stejně procesy jsou viditelné i při rozkladu rostlinného opadu (Šnajdr et al., 2011).

V průběhu dekompozice docházelo i v námi studovaném tlejícím dřevě k postupnému snižování C/N poměru z 328 na průměrnou hodnotu 82. Počáteční hodnoty C/N poměru se navíc lišily v závislosti na druhu dřeva (nejvyšší u smrku 328). V průběhu degradace nedošlo ke srovnání C/N poměrů na stejnou úroveň mezi různými druhy stromů. Podobný průběh C/N poměru byl pozorován i při rozkladu rostlinného opadu (dub), kde během 24 měsíců rozkladu došlo k poklesu ze 49 na 22 (Vořískova a Baldrian, 2013). Stoupání obsahu dusíku v tlejícím dřevě je zapříčiněno především translokací houbovým myceliem nebo fixací vzdušného dusíku bakteriemi (Parton et al., 2007; Laiho a Prescott, 1999; Mäkinen et al., 2006). Obecně v průběhu degradace organických substrátů dochází ke snížení C/N poměru a vzrůstání N.

Obsah ergosterolu v průběhu degradace v čase vzrůstá. Množství ergosterolu v degradovaných kmenech je druhově závislý, v tlejících bukových kmenech je jeho obsah přibližně dvakrát vyšší než u ostatních studovaných kmenů bez závislosti na délce dekompozice. Vysoký obsah ergosterolu v pozdějších stádiích rozkladu může souviset s výskytem vysokého množství mrtvého/živého houbového mycelia. Vyšší obsah ergosterolu u starších kmenů zároveň pozitivně koreluje se zvyšováním obsahu dusíku ve více rozložených kmenech (Colpaert et al., 1996). U buku výraznější hodnoty naznačují rychlejší prorůstání kmenů houbami, a s tím související rychlejší rozklad. Může to souviset s rozdílnou stavbou vodivých pletiv mezi krytosemennými (listnaté stromy) a nahosemennými (jehličnaté stromy) rostlinami. Vyspělejšími trachejemi (cévy) u krytosemenných mohou houbové hyfy prorůstat efektivněji než tracheidy (cévice) u nahosemenných rostlin (Weedon et al., 2009).

Aktivitou vyvíjejících se hubových společenstev v rozkládajícím se dřevě docházelo k poklesu pH v pozdějších stádiích rozkladu dřevní hmoty. Snižování hodnot pH během rozkladu má (společně s vlivem extracelulárních enzymů hub) významný vliv na vyvíjející se bakteriální společenstvo (Parton et al., 2007; Laiho a Prescott, 1999; Mäkinen et al., 2006). Růst bakteriálního společenstva je omezeno na menší rozmezí pH, zatímco houbová společenstva tolerují široké rozmezí pH, což zapříčiňuje změny v zastoupení bakterií, ve dřevě i opadu (Peñalva et al., 2008). V průběhu rozkladu organického materiálu dochází ke snižování pH, což má za následek změny v mikrobiální komunitě.

U všech druhů hub, v tlejícím dřevě, byla naměřena vyšší aktivita enzymů  $\beta$ -glukosidázy (štěpení disacharidů a oligosacharidů), fosfatázy (získávání fosfátu) a lipázy (uvolnění mastných kyseliny s krátkým řetězcem (Voříšková et al., 2013)) napříč všemi věkovými třídami. Vlastně to znamená, že houby se v rámci degradace zaměřují především na získání C, N, P a energie z dostupných polymerů. V pozdějších stádiích rozkladu dřeva (>32 let) se snížila aktivita většiny sledovaných enzymů. To může souviset se zvyšující se bohatostí a diverzitou bakteriálního společenstva tolerujícího nízké pH, tím zvýšení konkurence enzymů mezi mikroorganismy a nižší rychlostí rozkladu biomasy (Parton et al., 2007; Laiho a Prescott, 1999; Mäkinen et al., 2006). Konkurence mezi mikroorganismy ovlivňující rychlost rozkladu biomasy byl popsán tzv. „Gadgil effect“ (Gadgil and Gadgil, 1971), na inhibici saprotrofních organismů ektomykorhizními houbami při rozkladu opadu. V dalších studiích bylo zjištěno, že je rozklad a zastoupení jednotlivých mikroorganismů regulováno i dostupností N (Bending, 2003). Ve studii (Baldrian et al., 2014) bylo testováno 152 kmenů hub patřících do 112 druhů, dřevokazných i rozkládající opad. Většina druhů vykazovala aktivity kyselé fosfatázy (96-99%) a alkalické fosfatázy (96%). Velmi časté byly lipolytické enzymy a  $\beta$ -glukosidáza (93% druhů). Ve studii (Brabcová et al., 2016) na degradaci houbového mycelia *Tylopilus felleus* v lesním opadu a půdě byly také naměřené vysoké aktivity enzymů fosfatázy a lipázy. Vysoké aktivity námi měřených extracelulární enzymů (převážně fosfatázy a  $\beta$ -glukosidázy) potvrzuje i studie (Žifčáková et al., 2011) na rostlinném opadu (jehličí *Picea abies*). V této studii bylo testováno 12 řádů z kmene *Acomycota* a 4 řády z kmene *Basidiomycota*. Přítomnost a aktivita extracelulárních enzymů dokládá schopnost houbového

společenstva degradovat námi studované tlející dřevo i ostatní lignocelulolytické substráty.

U houbových společenstev ve všech druzích stromů byly detekovány nižší aktivity oxidativních enzymů (oxidáza, peroxidáza, Mn-peroxidáza a lakáza). Nižší ligninolytická aktivita byla dále detekována u hub při degradaci rostlinného (bukového) opadu u čeledi *Mycenaceae* (řád *Agaricales*) v *Basidiomycota*, a *Xylariaceae* (řád *Xylariales*) v *Ascomycota* (Osono, 2020). Ve výše zmíněné studii (Žižňáková et al., 2011), na rostlinném opadu (jehličí *Picea abies*), byla z oxidativních enzymů měřena lakáza a Mn-peroxidáza. Aktivity lakázy byly detekovány jak v počátečních fázích, tak v pokročilejších fázích rozkladu. U tlejícího dřeva v naší studii byly aktivity lakázy potvrzeny pouze v limitovaném množství u jedle (počátek dekompozice dřeva) a buku (pozdní fáze dekompozice dřeva). Stejně jako u oxidativních enzymů byla detekována v tlejícím dřevě nízká aktivita endoštěpících enzymů (endo-1,4- $\beta$ -glukanázy a endo-1,4- $\beta$ -xylanázy), která se postupně zvýšila u více rozložených kmenů. Nižší aktivity oxidativních a endoštěpících enzymů mohou souviset s tím, že se houby nejprve snaží využít dostupnější zdroje C a energie (rozklad celulózy nebo hemicelulózy) a k tomu využívají širokou škálu enzymů celulózy a hemicelulózy. Vyšší aktivity v pokročilejších fázích rozkladu mohou souviset se strukturou degradované hemicelulózy (van den Brink a de Vries, 2011), která by mohla být v pokročilejších fázích rozkladu dostupnější pro endo-1,4- $\beta$ -glukanázy a endo-1,4- $\beta$ -xylanázy štěpící vnitřní  $\beta$ -1,4-D vazby v polymeru (Baldrian a Valášková, 2008). Všechny tyto extracelulární enzymy, které využívají saprotrofními basidiomycety, se podílejí i na interspecifických interakcích s jinými půdními organismy a na přeměně půdní organické hmoty - lignocelulózy a huminových sloučenin (Baldrian, 2008).

### 6.3 Vývoj mikrobiálního společenstva v čase (2013-2017).

Vývoj mikrobiálního společenstva (z hlediska vývoje v houbové taxonomii) nepřinesl výraznější změny struktury hlavních dekompozitorů na úrovni kmene. Rozdíly byly pozorovány na úrovni řádu, u řádu *Polyporales* 20-32 let/2013 (15,0%) došlo k nárůstu četnosti 20-32 let/2017 (18,0%). A u řádu *Xylariales* došlo k nárůstu četnosti u buku v roce odběru 2017 (3%). Dominantní řády zůstávaly především *Hymenochaetales* (16,6%), *Agaricales* (15,8%) a *Polyporales* (18,0%). Většina řádů nalezených na tlejícím dřevě, byla nalezena také na již zmíněných rostlinných opadech (jehličnatých i listnatých stromů), v půdě (Osono, 2020; Bani et al., 2018). Detekovaný vývoj a nepatrné změny v zastoupení houbového společenstva probíhal podobně jako u již zmíněných rostlinných opadech (bukový a dubový), předchozích studiích rozkladu dřeva (Osono, 2020; Voříšková a Baldrian, 2013).

Dominantní rody byly: *Xylodon* (6,9%), *Resinicium* (7%), *Mycena* (8%), *Basidiodendron* (4,8%), *Spadicoides* (2,7%), *Kretzschmaria* (1,8%) a *Hyphodontia* (2,7%), vyšší v roce odběru 2017 a *Fomitopsis* (3,4%), *Megacollybia* (3,8%) a *Fomes* (1,9%) nižší v roce odběru 2017. Rody *Xylodon*, *Resinicium*, *Mycena*, *Basidiodendron*, naměřené u všech druhů stromů (vyšší roce odběru 2017). *Fomitopsis* a *Hyphodontia* chyběly u buku, zatímco rody *Spadicoides*, *Kretzschmaria*, *Megacollybia*, a *Fomes* se vyskytovaly pouze u buku s minimálním zastoupením u smrku a jedle. Zástupci rodu *Fomitopsis* a *Mycena* byly také zapojeny do degradace rostlinného opadu, jehličí *Picea abies* (Žiřňáková et al., 2011). Detekované houbové kmene, řády a dominantní rody lze považovat za hlavní dekompozitory organické hmoty, některé z nich byly nalezeny i rostlinných opadech, půdě, myceliu. Detekovaný vývoj zastoupení jednotlivých rodů podporuje naši hypotézu o tom, že se mikrobiální (houbová komunita) mění během rozkladu v čase i v relativně krátkém časovém horizontu.

Diversita společenstva vyjádřena indexem diversity 80% byla výrazně vyšší pro rok odběru 2017, což pravděpodobně souvisí s nižším počtem získaných sekvencí z předchozího odběru. Vysoký index diversity 80% u buku z roku odběru 2017 může souviset s rozdílnou stavbou vodivých pletiv mezi krytosemennými a nahosemennými rostlinami. U krytosemenných rostlin mohou houbové hyfy prorůstat efektivněji (Weedon et al., 2009).

Houbová společenstva lze rozřadit na základě jejich životní strategie do několika funkčních skupin (guild). U zkoumaných kmenů jednoznačně převažovaly saprotrofní organismy ve všech věkových třídách, bez závislosti na druhu dřeva. Podle předchozích studií jsou jednotlivé funkční skupiny spojovány v příslušnými habitaty př. saprotrofní a ektomykorhizní houby v lesních půdách, saprotrofní a arbuskulární mykorhizní houby v půdách travinatých oblastí nebo saprotrofní-dřevokazné a rostlinné-patogenní houby v rozkládajícím se dřevě (Tedersoo et al., 2015). V tlejícím dřevě jsme detekovali saprotrofní, patotrofní i symbiotrofní houby. Z dat se nedá jednoznačně určit jaký je obecná trend v poměru mezi těmito skupinami v tlejícím dřevě v průběhu rozkladu. Obecně patří saprotrofní houby mezi nejúčinnější rozkladače v mnoha ekosystémových složkách, jako je půda, rostlinný opad nebo rozklad dřeva (Baldrian et al., 2014). Saprotrofní houby byly detekované i v půdách, kde se mění jejich zastoupení v závislosti na klesající obsah organických látek a zvyšující se hloubce půdy. Zatímco saprotrofní houby jsou běžné v horních částech půdního profilu, mykorhizní dominance a relativní hojnost bakterií rostou s hloubkou (Šnajdr et al., 2008). V rozkládaném dřevě jsme žádné zástupce mykorhizních hub nedetekovali. Rostlinný opad je nejčastěji rozkládán saprotrofním basidiomycety, které lze zařadit mezi houby bílé hniloby. Na rozkladu rostlinného opadu se dále podílejí zástupci *Ascomycet* (Eichlerová et al., 2015). Saprotrofní houby byly také nalezeny ve studii (Kohout et al., 2020) na kořenech živých sazenic stromů *P. abies*. Na počátku rozkladu byly saprotrofní houby zastoupeny (15%) a v průběhu rozkladu docházelo ke zvyšování množství (20%).

Pomocí databáze FUNGuild (Tedersoo et al., 2015) lze, také zjistit o jaké skupiny hub (z hlediska enzymatického aparátu se jedná). Celkově bylo u všech stromů ve všech věkových třídách u obou dvou odběrů (2013 a 2017) zaznamenáno několikanásobně vyšší množství hub bílé hniloby. Houby hnědé a měkké hniloby, byly zastoupeny málo. Stejně jako v předcházejí studii (Baldrian et al., 2016), kde byly houby bílé hniloby zastoupeny po celou dobu rozkladu dřeva (52%) a houby hnědé hniloby (3.8%) v počátečních fázích rozkladu. Už ve studii (Gilbertson, 1980) na kmenech listnatých a jehličnatých stromů v Severní Americe, bylo prokázáno, že 90% všech dřevokazných hub patří mezi houby bílé hniloby. Ve studii (Boué et al., 2019) na pilinách z pěti náhodně vybraných pařezů, také nebyly houby hnědé hniloby abundantní. Při rozkladu dřeva tedy dominovaly houby bílé hniloby ačkoliv, je

enzymatický komplex hub hnědé hniloby lépe uzpůsoben konkurenci a degradaci organické hmoty (Rayner a Boddy, 1988; Boddy, 2000).



## 6.4 Analýza funkčních vlastností hub podílejících se na rozkladu

Vytváření plodnic je u hub ovlivňováno několika faktory (stejně jako rozklad dřeva). Mezi nejdůležitější patří dostupnost živin (zejména stavebních prvků C, N, P), změna teploty, dostupnost vody a světla. Důležitá je také interakce i s jinými houbami nebo bakteriemi (Moore et al., 2008). Houby vyskytující se na tlejících kmenech ve formě plodnic reprezentují společenstvo rozkladu, ale zdaleka neukazují na komplexnost houbového společenstva ve dřevě. Studium plodnic je však možno studovat možné funkční vlastnosti rozkladačů včetně jejich genomického potenciálu a genové exprese (data jsou součástí jiné studie).

Nejčastějšími houbovými rody u odebraných plodnic, po identifikaci, byly *Ganoderma applanatum* (bílá hniloba), *Trametes versicolor* (bílá hniloba), rod *Mycena* (bílá hniloba), *Fomitopsis pinicola* (hnědá hniloba) a *Pluteus cervinus* (bílá hniloba (Hiscox a Boddy, 2017)). Všichni zástupci patří k dominantním kmenům buď *Ascomycota* nebo *Basidiomycota* (Bani et al., 2018). Tyto houbové rody jsou zastoupeny při degradaci různých substrátů. Při degradaci dřevní hmoty (Baldrian et al., 2016) byly dominantními zástupci rody *Ganoderma* (5,3%) a *Fomitopsis* (3,1%), při degradaci rostlinného (bukového) opadu *Ganoderma*, *Trametes*, *Mycena* (Osono, 2020). Rody *Mycena* a *Fomitopsis* byly také zapojeny do degradace rostlinného opadu, jehličí *Picea abies* (Žifčáková et al., 2011). Některé z rodů tvořící plodnice byly nalezeny i ve vzorcích dřeva s vysokou relativní abundancí například rody *Mycena* (8%), *Fomitopsis* (1,1%) a *Trametes* (pod 1%). Nalezené houbové rody (ve formě plodnice tedy mohou zčásti reprezentovat strukturu společenstva dekompozitorů).

Prvky C, N a P jsou důležité nejenom pro růst samotných plodnic, ale také pro produkci velkého množství spór, které jsou pak transportovány vzduchem k dalším substrátům (Parfitt et al., 2010). Houby jsou schopné právě i díky svým extracelulárním enzymům tyto prvky získávat z různých substrátů (rostlinný opad, mycelium, tlející dřevo). Díky svým morfologickým vlastnostem jsou dále schopné tyto prvky translokovat do př. různých částí tlejícího dřeva a tím se i efektivněji šířit v daném substrátu. Uvolněné prvky jsou důležitým zdrojem také pro další mikroorganismy, zejména bakterie, žijící v daných substrátech. Houbová společenstva (př. mykorrhizní houby) jsou důležitými transportéry prvků N a P, které uvolňují z mrtvé organické

hmoty a transportují je k rostlinným symbiontům (Read, 2003). Prvkové složení jednotlivých testovaných plodnic se příliš nelišilo s výjimkou plodnice *Lycoperdon perlatum*, s vyšším množstvím dusíku a fosforu a plodnice *Pluteus cervinus*, se zvýšeným množstvím fosforu.

Dřevokazné houby produkují širokou škálu extracelulárních enzymů podílejících se na rozkladu lignocelulózy. Použitím genově zaměřených metatranskriptů byl nalezen soubor transkribovaných sekvencí pro lakázu, exocelulázu, oxidázy a glykosylhydrolázy, produkovanými kmeny *Ascomycota* a *Basidiomycota* (Baldrian et al., 2012; Kellner a Vandenbol, 2010). U plodnic hub byla prokázána enzymatická aktivita většiny zkoumaných extracelulárních enzymů. Fosfatázy, lipázy a 1,4- $\beta$ -glukosidázy vykazovaly nejvyšší aktivitu u většiny plodnic hub. Tyto enzymy jsou důležité pro získávání živin a prvků nezbytných pro další vývoj (získávání fosfátu, uvolnění mastných kyselin s krátkým řetězcem (Voříšková et al., 2013)). Aktivity extracelulárních enzymů se podobaly již výše zmíněným aktivitám nalezených ve vzorcích dřeva. Aktivity oxidativních enzymů byly detekovány pouze u hub bílé hniloby (například *Trametes versicolor*, vyšší aktivita enzymů lakáza, oxidáza a Mn-peroxidáza). Zatímco u hub hnědé hniloby (*Fomitopsis pinicola*, převažovala aktivita enzymů rozkládající celulózu). Houby hnědé hniloby degradují polysacharidy (celulóza a hemicelulóza) a lignin pouze modifikují (Ryvarden, 1991), zatímco houby bílé hniloby degradují lignin, celulózu a hemicelulózu (Gilbertson, 1980). Hodnoty aktivit enzymů mohly souviset se stářím odebrané plodnice, stářím kmene, abiotickými faktory prostředí nebo kompeticemi mezi jednotlivými druhy mikroorganismů (Kellner a Vandenbol, 2010; van den Brink a de Vries, 2011). Plodnice hub nalezených na tlejících kmenech tedy jednoznačně přispívají k dekompozici dřevní hmoty.

## 7 Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá strukturou a vývojem mikrobiálního společenstva se zaměřením na společenstvo hub na tlejícím dřevě v přirozených podmínkách lesního ekosystému Žofínského pralesa. Práce dále studuje chemismus rozkládaného dřeva, enzymové aktivity ve dřevě jako ukazatel aktivity mikrobiálních společenstev a množství houbové biomasy jako měřítko výskytu hlavních dekompozitorů – hub. Studium plodnic dřevokazných hub z místa studie doplňuje práce poznatky o struktuře houbového společenstva rozkládaného dřeva o fyziologické zhodnocení možností jednotlivých dekompozitorů.

V první části experimentu byly identifikovány plodnice odebrané ze zetlelých kmenů na stanovišti, jejich prvkové složení a enzymatická aktivita vůči strukturálním polymerům ve dřevě. Získané izoláty byly dále použity pro sekvenaci genomu vybraných hub a jeho analýzu (v rámci experimentu mimo rámec diplomové práce). Některé z rodů hub vytvářejících plodnice byly nalezeny ve vysokých relativních abundancích i v odebraných vzorcích dřeva: *Trametes*, *Fomes*, *Mycena*, *Fomitopsis*. U plodnic hub byly detekovány zvýšené aktivity zejména enzymů fosfatázy, lipázy a  $\beta$ -glukosidázy. Zvýšené enzymatické aktivity těchto enzymů byly nalezeny i ve vzorcích dřeva. Plodnice dřevokazných hub na tlejících kmenech tedy částečně reprezentují strukturu společenstva hub uvnitř tlejícího dřeva a svými funkčními vlastnosti přispívají k jeho rozkladu.

V druhé části experimentu bylo identifikováno houbové společenstvo ze vzorkovaných kmenů ve čtyřech stupních rozkladu s ohledem na druh rozkládaného dřeva a chemických změn v rozkládaném substrátu. Bylo potvrzeno, že v průběhu rozkladu dochází ke snižování C/N poměru. Důvodem je pravděpodobně translokace N houbami a fixace N bakteriemi v pozdějším stádiu rozkladu (Parton et al., 2007). Během rozkladu dochází k akumulaci houbové biomasy a snížení pH aktivitou hub. Změny struktury houbového společenstva v průběhu rozkladu dřeva jsou detekovatelné na úrovni řádů. Majoritními houbovými řády v tlejících kmenech jsou *Hymenochaetales* (16,6%), *Agaricales* (15,8%) a *Polyporales* (18,0%), a *Helotiales* (10,8%), na úrovni rodů jsou častými zástupci: *Xylodon* (6,9%), *Resinicium* (7%), *Mycena* (8%), *Basidioidendron* (4,8%). Výskyt některých rodů byl specificky vázán na druh dřeva: *Kretzschmaria* nebo *Fomes* byly detekovány pouze na buku. Z funkčního

hlediska dominovali po celou dobu rozkladu zástupci saprotrofů a hub bílé hniloby, zatímco houby hnědé hniloby byly pouze v počátečních fázích rozkladu. Všeobecně byly ve dřevě detekovány nejvyšší aktivity fosfatázy, lipázy a  $\beta$ -glukozidázy. Enzymová aktivita jako ukazatel rozkladného procesu se však snížila v pozdních fázích rozkladu.

Struktura houbového společenstva v tlejícím dřevě se vyvíjí v čase. Na nižších taxonomických úrovních lze tyto změny pozorovat i v krátkém období 4 let. Plodnice dřevokazných hub přítomné na rozkládajících se kmenech mohou částečně reprezentovat strukturu aktivních rozkladačů dřevní hmoty.

## 8 Seznam použité literatury

Ahmad, M., Taylor, C.R., Pink, D., Burton, K., Eastwood, D., Bending, G.D., Bugg, T.D.H. (2010): Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. *Molecular BioSystems*, 6, 815–21.

Ansorge, W.J. (2009): Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol*, 25(4), 195-203.

Baldrian, P. (2017): Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 109–130.

Baldrian, P., (2008): Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*, 1(1), 4-12.

Baldrian, P., Eichlerová, I., Dobiášová, P., Lisá, L., Homolka, L., Žifčáková, L. (2014): Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology*, 13, 10–22.

Baldrian, P., Steffen, K.T., Cajthaml, T., Šnajdr, J. (2007): Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. *Research in Microbiology*, 158, 447–455.

Baldrian, P., Valášková, V. (2008): Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 501-21.

Baldrian, P., Větrovský, T., Cajthaml, T. (2013): Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. *Fungal Ecology*, 6, 1-11.

Baldrian, P., Zrůstová, P., Tláškal, V., Davidová, A., Merhautová, V., Vrška, T. (2016): Fungi associated with decomposing deadwood in a natural beech-dominated forest. *Fungal Ecology*, 23, 109–122.

Bani, A., Pioli, S., Ventura, M., Panzacchi, P., Borruso, L., Tognetti, R., Tonon, G., Brusetti, L. (2018): The role of microbial community in the decomposition of leaf litter and deadwood. *Applied Soil Ecology*, 126, 75–84.

Bayer, E.A., Belaich, J.-P., Shoham, Y., Lamed, R. (2004): The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, 58, 521–54.

Béguin, P., Aubert, J.-P. (1994): The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 25–58.

Bending, G.D. (2003): Litter decomposition, ectomycorrhizal roots and the “Gadgil” effect. *New Phytologist*, 158, 228–229.

Berg, B., McClaugherty, C., Berg, B. (2014): Decomposition as a Process: Some Main Features, in: *Plant Litter*. Springer Berlin Heidelberg, 11–34.

- Berlemont, R., Martiny, A.C. (2015): Genomic potential for polysaccharide deconstruction in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 1513–19.
- Bermek, H. (2009): Lignin, lignocellulose, ligninase. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, 373-384.
- Bissaro, B. (2017): Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr Opin Struct Biol*, 44, 67-76.
- Boddy, L. (2001): Fungal Community Ecology and Wood Decomposition Processes in Angiosperms: From Standing Tree to Complete Decay of Coarse Woody Debris. *Ecological Bulletins*, 49(49), 43–56.
- Boddy, L. (2000): Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 185–194.
- Boddy, L., Heilmann-Clausen, J. (2008): *Basidiomycete* community development in temperate angiosperm wood. *British Mycological Society Symposia Series*, 28, 211–237.
- Boddy, L., Hiscox, J. (2017): Fungal Ecology: Principles and Mechanisms of Colonization and Competition by Saprotrophic Fungi, in: *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, 4(6), 293–308.
- Boddy, L., Watkinson, S.C. (1995): Wood decomposition, higher fungi, and their role in nutrient redistribution. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1377-1383.
- Boué, C., DeBellis, T., Venier, L.A., Work, T.T., Kembel, S.W. (2019): Limited initial impacts of biomass harvesting on composition of wood-inhabiting fungi within residual stumps. *PeerJ*, 7, e8027.
- Brabcová, V., Nováková, M., Davidová, A., Baldrian, P. (2016): Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytologist*, 210, 1369–1381.
- Brabcová, V., Štursová, M., Baldrian, P. (2018): Nutrient content affects the turnover of fungal biomass in forest topsoil and the composition of associated microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 118, 187–198.
- Brumm, P., Brumm, P., Xie, D., Xie, D., Allen, L., Allen, L., Mead, D.A., Mead, D.A. (2018): Hydrolysis of Cellulose by Soluble *Clostridium Thermocellum* and *Acidothermus Cellulolyticus* Cellulases. *Journal of Enzymes*, 1, 5–19.
- Brunow, G., Lundquist, K. (2010): Functional Groups and Bonding Patterns in Lignin (Including the Lignin-Carbohydrate Complexes), in: *Lignin and Lignans*. CRC Press, 267–299.
- Clausen, C.A. (1996): Bacterial associations with decaying wood: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37, 101–107.
- Colpa, D., Fraaije, M.W., Van Bloois, E. (2013): DyP-type peroxidases: A

promising and versatile class of enzymes. Article in Journal of Industrial Microbiology, 41, 1–7.

Colpaert, J. V., Van Laere, A., Van Assche, J.A. (1996): Carbon and nitrogen allocation in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings. Tree Physiology, 16, 787–793.

Cooke, R., Whipps, J. (1993): Ecophysiology of fungi. Wiley-Blackwell, 348.

Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Allison, S.D., Bauhus, J., Eggleton, P., Preston, C.M., Scarff, F., Weedon, J.T., Wirth, C., Zanne, A.E. (2009): Plant traits and wood fates across the globe: Rotted, burned, or consumed?. Global Change Biology, 15, 2431–2449.

Daniel, S.L., Pils, C., Drake, H.L. (2007): Anaerobic oxalate consumption by microorganisms in forest soils. Research in Microbiology, 158(3), 303-9.

Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R.S., Formanek, P.(2017): Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review. Sustainability, 9(7), 1163.

Dekker, R.F.H. (1985): Biodegradation of the Hemicelluloses Screening of Celomycete fungi for extracellular lipases. Biochemistry of Microbial Degradation, 233–277.

Dinwoodie, J. (2000): Timber: Its nature and behaviour. CRC Press, 272.

Doi, R.H., Kosugi, A. (2004): Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. Nature Reviews Microbiology. Nature Reviews Microbiology, 2, 541–551.

Eichlerová, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisá, L., Dobiášová, P., Baldrian, P. (2015): Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. Fungal Ecology, 13, 10–22.

Ezeilo, U.R., Zakaria, I.I., Huyop, F., Wahab, R.A. (2017): Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monooxygenases. Agriculture and Environmental Biotechnology, 647-662.

Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya, L. V., Okoh, A.I. (2017): Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. Microbiologyopen, 6(1), e00394.

Folman, L. (2008): Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. FEMS Microbiol Ecol., 63(2), 181-91.

Gadgil, R.L., Gadgil, P.D. (1971): Mycorrhiza and litter decomposition. Nature, 233, 133.

Gauthier, S., Bernier, P., Kuuluvainen, T., Shvidenko, A.Z., Schepaschenko,

- D.G. (2015): Boreal forest health and global change. *Science* (New York), 349, 819–22.
- Gilbertson, R.L. (1980): Wood-Rotting Fungi of North America. *Mycologia*, 72, 1.
- Gonzalo, G. de, Colpa, D. (2016): Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 236, 110-119.
- Haq, I., Graupner, K. (2014): The genome of the fungal-interactive soil bacterium *Burkholderia terrae* BS001—a plethora of outstanding interactive capabilities unveiled. *Genome Biol Evol.*, 6(7), 1652-68.
- Hatakka, A., Hammel, K.E. (2011): Fungal Biodegradation of Lignocelluloses, in: *Industrial Applications*. Springer Berlin Heidelberg, 319–340.
- Hervé, M.R., Cortesero, A.M. (2016): Potential for oilseed rape resistance in pollen beetle control. *Arthropod-Plant Interactions*, 10, 463–475.
- Hiscox, J., Boddy, L. (2017): Armed and dangerous – Chemical warfare in wood decay communities. *Fungal Biology Reviews*, 31, 169-184.
- Hon, D.N.S. (1994): Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose*, 1, 1–25.
- Hoppe, B., Krüger, D., Kahl, T., Arnstadt, T., Buscot, F., Bauhus, J., Wubet, T. (2015): A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. *Scientific Reports*, 5, 9456.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G.H. (2012): Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 45.
- Huffman, J.A., Prenni, A.J., Demott, P.J., Pöhlker, C., Mason, R.H., Robinson, N.H., Fröhlich-Nowoisky, J. (2013): High concentrations of biological aerosol particles and ice nuclei during and after rain. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13, 6151–6164.
- Janík, D., Král, K., Adam, D., Hort, L., Samonil, P., Unar, P., Vrska, T., McMahon, S. (2016): Tree spatial patterns of *Fagus sylvatica* expansion over 37 years. *Forest Ecology and Management*, 375, 134–145.
- Janusz, G., Pawlik, A. (2017): Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol Rev.*, 41(6), 941-962.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R. (2005): Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, 2931-2944.
- Jeffries, P. (1995): Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1284-1290.



- Johnston, S.R., Boddy, L., Weightman, A.J. (2016): Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 179.
- Kerem, Z., Jensen, K.A., Hammel, K.E. (1999): Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Letters*, 446, 49–54.
- Kielak, A.M., Scheublin, T.R., Mendes, L.W., van Veen, J.A., Kuramae, E.E. (2016): Bacterial community succession in pine-wood decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 7, 231.
- King, B. Waite, J. (1979): Translocation of nitrogen. *International Biodeterioration Bulletin*, 19, 71-96.
- Koeck, D., Pechtl, A., Zverlov, V. (2014): Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 171-183.
- Král, K., Janík, D., Vrška, T., Adam, D., Hort, L., Unar, P., Šamonil, P. (2010): Local variability of stand structural features in beech dominated natural forests of Central Europe: Implications for sampling. *Forest Ecology and Management*, 260, 2196–2203.
- Král, K., Valtera, M., Janík, D., Šamonil, P., Vrška, T. (2014): Spatial variability of general stand characteristics in central European beech-dominated natural stands - Effects of scale. *Forest Ecology and Management*, 328, 353–364.
- Kumar, V. (2000): A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Laiho, R., Prescott, C.E. (1999): The contribution of coarse woody debris to carbon, nitrogen, and phosphorus cycles in three Rocky Mountain coniferous forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 29, 1592–1603.
- Lenhart, K., Bunge, M., Ratering, S. (2012): Evidence for methane production by saprotrophic fungi. *Nature.Com.*, 3, 1045.
- Leonowicz, A., Cho, N. (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology*, 41, 185-227.
- Leveau, J.H.J., Preston, G.M. (2008): Bacterial mycophagy: Definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytologist*, 177(4), 859-76.
- Liu, W., Schaefer, D., Qiao, L., Liu, X. (2013): What controls the variability of wood-decay rates? *Forest Ecology and Management*, 310, 623-631.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., Baldrian, P. (2018): Drivers of microbial community structure in forest soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4331–4338.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., Baldrian, P. (2017): Forest Soil Bacteria:

Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiol Mol Biol Rev*, 81(2), 63-16.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2014): The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42, 490-5.

López-Mondéjar, R., Brabcová, V., Štursová, M., Davidová, A., Jansa, J., Cajthaml, T., Baldrian, P. (2018): Decomposer food web in a deciduous forest shows high share of generalist microorganisms and importance of microbial biomass recycling. *ISME Journal*, 12, 1768–1778.

Lustenhouwer, N., Maynard, D.S., Bradford, M.A., Lindner, D.L., Oberle, B., Zanne, A.E., Crowther, T.W. (2020): A trait-based understanding of wood decomposition by fungi. *PNAS*, 117 (21), 11551–11558.

Magnússon, R.Í., Tietema, A., Cornelissen, J.H.C., Hefting, M.M., Kalbitz, K. (2016): Tamm Review: Sequestration of carbon from coarse woody debris in forest soils. *Forest Ecology and Management*, 377, 1–15.

Mäkinen, H., Hynynen, J., Siitonen, J., Sievänen, R. (2006): Predicting the decomposition of scots pine, norway spruce, and birch stems in Finland. *Ecological Applications*, 16, 1865–1879.

Mellerowicz, E.J., Sundberg, B. (2008): Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology*, (3), 293-300.

Meng, L., Jing, X., Liu, J., Fei, Z., Dyson, P.J., Liu, X. (2016): MnO<sub>2</sub> Nanosheets as an Artificial Enzyme to Mimic Oxidase for Rapid and Sensitive Detection of Glutathione. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 69-74.

Mercado, J.E., Hofstetter, R.W., Reboletti, D.M., Negrón, J.F. (2014): Phoretic symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae hopkins*). *Forest Science*, 60, 512–526.

Moore, D., Gange, A.C., Gange, E.G., Boddy, L. (2008): Fruit bodies: Their production and development in relation to environment. *British Mycological Society Symposia Series*, 28, 79–103.

Naudts, K., Chen, Y., McGrath, M.J., Ryder, J., Valade, A., Otto, J., Luysaert, S. (2016): Forest management: Europe's forest management did not mitigate climate warming. *Science*, 351, 597–599.

Nazir, R., Tazetdinova, D.I., van Elsas, J.D. (2014): *Burkholderia terra* BS001 migrates proficiently with diverse fungal hosts through soil and provides protection from antifungal agents. *Frontiers in Microbiology*, 5, 598.

Nazir, R., Warmink, J.A., Voordes, D.C., van de Bovenkamp, H.H., van Elsas, J.D. (2013): Inhibition of Mushroom Formation and Induction of Glycerol. *Microbial Ecology*, 65, 245–254.

- Nguyen, H.C., Su, C.-H., Chinh Nguyen, H., Liang, S.-H., Chen, S.-S., Lin, J.-H., Chien, C.-C. (2018): Liquid Lipase-Catalyzed Esterification of Oleic Acid with Methanol for Biodiesel. Article in *Energy Conversion and Management*, 11(5), 1085.
- Osono, T. (2020): Functional diversity of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*, 35, 30-43.
- Parfitt, D., Hunt, J., Dockrell, D., Rogers, H.J., Boddy, L. (2010): Do all trees carry the seeds of their own destruction?. *Fungal Ecology*, 3, 338–346.
- Parton, W., Silver, W.L., Burke, I.C., Grassens, L., Harmon, M.E., Currie, W.S., King, J.Y., Adair, E.C., Brandt, L.A., Hart, S.C., Fasth, B. (2007): Global-scale similarities in nitrogen release patterns during long-term decomposition. *Science*, 315, 361–364.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H.N. (2008): Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*, 16(6), 291-300.
- Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Hoppe, B., Jariyavidyanont, K., Arnstadt, T., Baber, K., Otto, P., Kellner, H. (2018): Determinants of deadwood-inhabiting fungal communities in temperate forests: Molecular evidence from a large scale deadwood decomposition experiment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2120.
- Rajala, T., Peltoniemi, M., Hantula, J., Mäkipää, R., Pennanen, T. (2011): RNA reveals a succession of active fungi during the decay of Norway spruce logs. *Fungal Ecology*, 4, 437–448.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W. (2004): Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3, 29–60.
- Raven, P., Evert, R., Eichhorn, S. (1999): *Biology of plants*. No.Ed. 6. ed. W.H. Freeman and Co., New York (USA).
- Ravichandran, A., Sridhar, M. (2017): Insights into the mechanism of lignocellulose degradation by versatile peroxidases. *Current science*, 113(1), 35-42.
- Rayner, A.D.M., Boddy, L. (1988): Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. *Fungal Decomposition of Wood*. John Wiley & Sons Ltd.(UK).
- Read, D. a J.P. (2003): Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist*, 157, 475–492.
- Rinne, K.T., Rajala, T., Peltoniemi, K., Chen, J., Smolander, A., Mäkipää, R. (2017): Accumulation rates and sources of external nitrogen in decaying wood in a Norway spruce dominated forest. *Functional Ecology*, 31, 530–541.

- Rinta-Kanto, J.M., Sinkko, H., Rajala, T., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Tamminen, M. V., Timonen, S. (2016): Natural decay process affects the abundance and community structure of *Bacteria* and *Archaea* in *Picea abies*. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 87.
- Robinson, J.M. (1990): Lignin, land plants, and fungi: Biological evolution affecting Phanerozoic oxygen balance. *Geology*, 18, 607.
- Rudnick, M.B., van Veen, J.A., de Boer, W. (2015): Oxalic acid: A signal molecule for fungus-feeding bacteria of the genus *Collimonas*? *Environmental Microbiology Reports*, 7, 709–714.
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R.P., Mäkelä, M.R. (2014): Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from *Basidiomycetes*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78, 614–649.
- Samanta, A., Breger, J.C., Susumu, K., Oh, E., Walper, S.A. (2018): DNA–Nanoparticle Composites Synergistically Enhance Organophosphate Hydrolase Enzymatic Activity. *ACS Applied Nano Materials*, 1, 3091–3097.
- Šamonil, P., Doleželová, P., Vašíčková, I., Adam, D., Valtera, M., Král, K., Janík, D., Šebková, B. (2013): Individual-based approach to the detection of disturbance history through spatial scales in a natural beech-dominated forest. *Journal of Vegetation Science*, 24, 1167–1184.
- Šamonil, P., Timková, J., Vašíčková, I. (2016): Uncertainty in the detection of disturbance spatial patterns in temperate forests. *Dendrochronologia*, 37, 46–56.
- Schneider, T., Gerrits, B., Gassmann, R., Schmid, E., Gessner, M.O., Richter, A., Battin, T., Eberl, L., Riedel, K. (2010): Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics*, 10, 1819–30.
- Schneider, T., Keiblinger, K.M., Schmid, E., Sterflinger-Gleixner, K., Ellersdorfer, G. (2012): Who is who in litter decomposition Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *ISME Journal*, 6, 1749–1762.
- Schwarz, W.H. (2001): The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 634–49.
- Schwarze, F., Engels, J., Mattheck, C. (2013): *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Seibold, S., Bäessler, C., Brandl, R., Gossner, M.M., Thorn, S., Ulyshen, M.D., Müller, J. (2015): Experimental studies of dead-wood biodiversity. *Biological Conservation*, 191, 139–149.
- Sharma, S. (2016): Diversity of microbial cellulase system. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 49–64.
- Shipcott, J., Clarkson, G., Savva, I., Boddy, L., Savoury, M., Hiscox, J., Choimes, A., Amargant Cumbriu, X., Lloyd, M., Powell, G. (2016): Effects of

pre-colonisation and temperature on interspecific fungal interactions in wood. *Fungal Ecology*, 21, 32–42.

Sjostrom, E. (1993): *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Academic Press, 293.

Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valášková, V., Merhautová, V., Petránková, M., Spetz, P., Leppänen, K., Baldrian, P. (2011): Transformation of *Quercus petraea* litter: Successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 75, 291–303.

Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Herinková, J., Cajthaml, T., Baldrian, P. (2008): Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2068–2075.

Starke, R., Kermer, R., Ullmann-Zeunert, L., Baldwin, I.T., Seifert, J., Bastida, F., von Bergen, M., Jehmlich, N. (2016): Bacteria dominate the short-term assimilation of plant-derived N in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 96, 30–38.

Stokland, J.N., Siitonen, J., Jonsson, B.G. (2012): *Biodiversity in dead wood*. Cambridge University Press.

Stringer, J.W., Loftis, D.L., Lacki, M., Barnes, T., Muller, R. (1999): Characterization of coarse woody debris across a 100 year chronosequence of upland oak-hickory forest. Gen. Tech. Rep. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station, 60-67.

Su, Y., Xian, H., Shi, S., Zhang, C., Manik, S.M.N., Mao, J., Zhang, G., Liao, W., Wang, Q., Liu, H. (2016): Biodegradation of lignin and nicotine with white rot fungi for the delignification and detoxification of tobacco stalk. *BMC Biotechnology*, 16(1), 81.

Sukharnikov, L.O., Cantwell, B.J., Podar, M., Zhulin, I.B. (2011): Cellulases: Ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology*, 29(10), 473-9.

Takeda, H., Osono, T., Hiroshi Takeda, A.E. (2005): Decomposition of organic chemical components in relation to nitrogen dynamics in leaf litter of 14 tree species in a cool temperate forest. *Springer*, 20, 41–49.

Tedersoo, L., Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy, P.G. (2015): FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 41-248.

Tláškal, V., Voříšková, J., Baldrian, P. (2016): Bacterial succession on decomposing leaf litter exhibits a specific occurrence pattern of cellulolytic taxa and potential decomposers of fungal mycelia. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 177.

- Tláskal, V., Zrůstová, P., Vrška, T., Baldrian, P. (2017): Bacteria associated with decomposing dead wood in a natural temperate forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 157.
- Tsuneda, A., Thorn, R.G. (1995): Interactions of wood decay fungi with other microorganisms, with emphasis on the degradation of cell walls. *Canadian Journal of Botany*, 73, 1325-1333.
- Valášková, V., Boer, W. De (2009): Phylogenetic composition and properties of bacteria coexisting with the fungus *Hypholoma fasciculare* in decaying wood. *ISME J*, 3(10), 1218-21.
- van den Brink, J., de Vries, R.P. (2011): Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1477–92.
- Van Der Wal, A., De Boer, W., Smant, W., Van Veen, J.A. (2007): Initial decay of woody fragments in soil is influenced by size, vertical position, nitrogen availability and soil origin. *Plant and Soil*, 301, 189–201.
- Várnai, A., Mäkelä, M.R., Djajadi, D.T., Rahikainen, J., Hatakka, A., Viikari, L. (2014): Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press Inc., 103–165.
- Vořískova, J., Baldrian, P. (2013): Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME Journal*, 7, 477–486.
- Voro'ev, A. V., de Boer, W., Folman, L.B. (2009): *Methylovirgula ligni* gen. nov., sp. nov., a nobligately acidophilic, facultatively methylotrophic bacterium with a highly divergent *mxoF* gene. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2538–2545.
- Weedon, J.T., Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Zanne, A.E., Wirth, C., Coomes, D.A. (2009): Global meta-analysis of wood decomposition rates: a role for trait variation among tree species? *Ecology Letters*, 12, 45–56.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D. (2006): Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 97–104.
- Wilson, D.B. (2011): Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 259–63.
- Zell, J., Kändler, G., Hanewinkel, M. (2009): Predicting constant decay rates of coarse woody debris-A meta-analysis approach with a mixed model. *Ecological Modelling*, 220, 904–912.
- Zhang, R., Li, C., Wang, J., Yan, Y. (2019): Microbial Ligninolysis: Toward a Bottom-Up Approach for Lignin Upgrading. *Biochemistry*, 58, 1501–1510.
- Žifčáková, L., Dobiášová, P., Kolářová, Z., Koukol, O., Baldrian, P. (2011): Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles. *Fungal Ecology*,

4, 427–436.

Žifčáková, L., Větrovský, T., Howe, A., Baldrian, P. (2016): Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology*, 18, 288–301.

Žifčáková, L., Větrovský, T., Lombard, V., Henrissat, B., Howe, A., Baldrian, P. (2017): Feed in summer, rest in winter: microbial carbon utilization in forest topsoil. *Microbiome*, 5, 122.

Zimmermann, W. (1990): Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13(2-3), 119-130.