

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv zvýšené teploty na dekompozici houbové nekromasy v tundře

**Effect of increased temperature on fungal necromass
decomposition in tundra**

Bc. Andrea Moravcová

Školitel: Mgr. Petr Kohout, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Jana Albrechtová, 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 dne 7. 8. 2020

.....

Podpis

Poděkování:

Velké poděkování patří mému školiteli Mgr. Petrovi Kohoutovi, Ph.D. za možnost vypracovat diplomovou práci pod jeho vedením, cenné rady a trpělivý přístup. Děkuji RNDr. Petrovi Mackovi, Ph.D. a Mgr. Martinovi Lulákovi za pomoc zejména při terénní práci na Špicberkách. Rovněž děkuji svému kolegovi Mgr. Lukášovi Vlkovi za ochotu kdykoli pomoci a poradit. V neposlední řadě děkuji Mgr. Tereze Vlkové, Mgr. Martině Karáskové, Mgr. Mirce Skálové a Mgr. Petře Tláskalové.

Děkuji všem dobrovolníkům na terénní stanici Nostoc, kteří s nevídanou odvahou ochutnali mycelium *Phialocephala fortinii*, čímž prokázali, že tato houba není jedovatá!

Projekt byl financován z GAČR 16-20569S (Role mykohrizních a endofytických hub a jejich vzájemná interakce v dekompozici kořenů hostitelských rostlin).

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá dekompozicí houbové nekromasy v arktické tundře (souostroví Svalbard) pod faktorem klimatické změny (simulovaná zvýšením teploty uvnitř Open Top Chamber). Byla porovnána dynamika dekompozice houbové nekromasy u dvou vybraných hub, které se liší v úrovni melanizace a v poměru C:N – *Laccaria laccata* (hyalinní, nižší poměr C:N) a *Phialocephala fortinii* (melanizovaná, vyšší poměr C:N). Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vliv úrovně melanizace nekromasy a zvýšené teploty na dynamiku dekompozice houbové nekromasy a na složení komunity dekompozitorů (houby, bakterie). Experiment byl zaměřen na sledování dynamiky dekompozice houbové nekromasy, změny enzymové aktivity na rozkládajícím se myceliu, změny obsahu melaninu a poměru C:N v průběhu degradace a také na analýzu mikrobiálního společenstva na rozkládajícím se myceliu.

V průběhu celé inkubace se nekromasa *P. fortinii* rozkládala pomaleji než nekromasa *L. laccata*. Za rozdíly v dynamice dekompozice bylo zodpovědné hlavně biochemické složení houbové nekromasy (poměr C:N, obsah melaninu). Obsah melaninu se v průběhu dekompozice zvyšoval u obou typů mycelia. Poměr C:N v nekromase *L. laccata* v průběhu dekompozice stoupal, kdežto v nekromase *P. fortinii* zůstal beze změny.

Na dekompozici houbové nekromasy se podílely hlavně houby z oddělení *Mucoromycota* a *Ascomycota*. V počáteční fázi dekompozice převládaly houby identifikované jako plísňe, kdežto v pozdější fázi převládly saprotrofní houby. Dekompozice houbové nekromasy se účastnily převážně bakterie z kmene *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. Délka inkubace byla hlavním vysvětlujícím faktorem rozdílů ve složení mikrobiálních komunit na rozkládajícím se myceliu.

Vliv zvýšené teploty na dynamiku dekompozice houbové nekromasy a na složení komunity mikroorganismů se v průběhu celé inkubace (osm týdnů) neprojevil.

Klíčová slova: dekompozice, houby, bakterie, arktická tundra, klimatická změna

Abstract

This diploma thesis deals with the decomposition of fungal necromass in the Arctic tundra (Svalbard archipelago) under the factor of climate change (simulated by an increased temperature inside the Open Top Chamber). The dynamics of fungal necromass decomposition of two selected fungi, which differ in the level of melanin content and in C:N ratio – *Laccaria laccata* (hyaline, lower C:N ratio) and *Phialocephala fortinii* (melanized, higher C:N ratio), was compared. The aim of the work was to evaluate the influence of melanization level of fungal necromass and elevated temperature on the dynamics of fungal necromass decomposition and on the community composition of the decomposers (fungi, bacteria). The experiment focused on monitoring the dynamics of fungal necromass decomposition, changes in enzyme activity, changes in melanin content and C:N ratio during decomposition, as well as on the analysis of the microbial community composition on decomposing mycelium.

Throughout the whole incubation, the necromass of *P. fortinii* decomposed more slowly than the necromass of *L. laccata*. The differences in the dynamics of decomposition were mainly due to the biochemical composition of the fungal necromass (C:N ratio and melanin content). The melanin content increased in both types of mycelium during decomposition. The C:N ratio in the necromass of *L. laccata* increased during decomposition, while in the necromass of *P. fortinii* remained unchanged.

The decomposition of the fungal necromass was mainly influenced by fungi from the division *Mucoromycota* and *Ascomycota*. The initial phase of the decomposition was driven mainly by molds, while in the later phase saprotrophic fungi predominated. Fungal necromass decomposition involved mainly bacteria from the phylum *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. The length of incubation was the main explanatory factor for differences in the composition of microbial communities.

The effect of elevated temperature on the dynamics of fungal necromass decomposition and on the composition of the microbial community was not detected during the entire incubation (eight weeks).

Key words: decomposition, fungi, bacteria, arctic tundra, climate change

Seznam zkratek

- ABTS - 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazolin-6-kyselina sulfonová)
- ACIA – Arctic Climate Impact Assessment (hodnocení arktického klimatu)
- AM – arbuskulární mykorhiza/arbuskulárně mykorhizní (dle kontextu)
- AMC – 7-amino-4-methylkumarin
- ANOVA – analysis of variance (analýza rozptylu)
- DHN – dihydroxynaftalen
- DMSO – dimethylsulfoxid
- EcM – ektomykorhiza/ektomykorhizní (dle kontextu)
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- ErM – erikoidní mykorhiza/erikoidně mykorhizní (dle kontextu)
- L-DOPA – 3,4-dihydroxyfenylalanin
- MBTH – 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone hydrochloride
- MMN – modified Merlin-Norkans (modifikované médium dle Merlina a Norkanse)
- MUF – 4-methylumbellyferol
- MUFaG – 4-methylumbellyferyl- α -D-glukopyranosid
- MUFC – 4-methylumbellyferyl-N-celobiosid
- MUFG – 4-methylumbellyferyl- β -D-glukopyranosid
- MUFL – 4-methylumbellyferyl- β -D-galaktopyranosid
- MUFM – 4-methylumbellyferyl- β -D-manopyranosid
- MUFN – 4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid
- MUFP – 4-methylumbellyferyl-fosfát
- MUFX – 4-methylumbellyferyl- β -D-xylopyranosid
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)
- NM – nemykorhizní
- NMDS – Non-metric multidimensional scaling (nemetrické vícerozměrné škálování)
- OTC – Open Top Chamber (komory s otevřeným vrchem)
- OTU – Operational taxonomic unit (operační taxonomická jednotka)
- PCA – Principal Component Analysis
- PCNM – Principal Coordinates of Neighbour Matrices
- PERMANOVA – Permutational Multivariate Analysis of Variance (permutační analýza variance)
- POM – particulate organic matter (půdní organická hmota)
- TAE – tris-acetát-EDTA

OBSAH

ÚVOD	8
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
1.1 KOLOBĚH UHLÍKU.....	10
1.2 PŮDNÍ ORGANICKÁ HMOTA.....	11
1.3 DEKOMPOZICE HOUBOVÉ NEKROMASY.....	12
1.3.1 Vnitřní faktory	13
1.3.2 Vnější faktory	23
1.3.3 Dynamika dekompozice	31
2 CÍLE PRÁCE.....	32
3 MATERIÁL A METODY	33
3.1 PŘÍPRAVA MATERIÁLU PRO TERÉNNÍ EXPERIMENT	33
3.1.1 Kultivace hub.....	33
3.2 POPIS LOKALITY A PRŮBĚHU ZALOŽENÍ EXPERIMENTU V TERÉNU.....	34
3.2.1 Popis lokality – souostroví Svalbard.....	34
3.2.2 Provedení terénního experimentu	36
3.3 STANOVENÍ ÚBYTKU SUBSTRÁTU	38
3.4 STANOVENÍ OBSAHU MELANINU.....	38
3.5 C:N ANALÝZA.....	39
3.6 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY.....	40
3.6.1 Stanovení aktivity hydrolytických enzymů	40
3.6.2 Stanovení aktivity oxidativních enzymů	42
3.7 ANALÝZA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA NA ROZKLÁDAJÍCÍM SE MYCELIU.....	43
3.7.1 Izolace DNA.....	43
3.7.2 PCR.....	44
3.7.3 Příprava knihoven pro sekvenaci	46
3.8 BIOINFORMATICKÉ ZPRACOVÁNÍ SEKVENČNÍCH DAT.....	47
3.9 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	47
4 VÝSLEDKY	49
4.1 DYNAMIKA ROZKLADU HOUBOVÉ NEKROMASY	49
4.2 OBSAH MELANINU V PRŮBĚHU DEKOMPOZICE HOUBOVÉ NEKROMASY.....	51
4.3 VLIV POMĚRU C:N NA DEKOMPOZICI HOUBOVÉ NEKROMASY.....	54
4.4 ENZYMOVÁ AKTIVITA V PRŮBĚHU DEKOMPOZICE HOUBOVÉ NEKROMASY.....	57

4.4.1 Hydrolytické enzymy	57
4.4.2 Oxidativní enzymy	67
4.5 MIKROBIÁLNÍ SPOLEČENSTVO NA ROZKLÁDAJÍCÍM SE MYCELIU.....	67
4.5.1 Společenstvo hub na rozkládajícím se myceliu	67
4.5.2 Společenstvo bakterií na rozkládajícím se myceliu	73
5 DISKUZE	78
ZÁVĚR	88
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91

Úvod

Houby jsou eukaryotické organismy, které zastávají důležité role v řízení významných ekosystémových procesů. Houby jsou hlavní rozkladači organické hmoty, mohou přispívat jak k mineralizaci, tak k sekvestraci uhlíkatých látek a tím mají podstatnou úlohu při kontrole uhlíkové rovnováhy v půdě (Clemmensen et al., 2015; Clemmensen et al., 2013; Crowther et al., 2019). Houby mohou žít volně v půdě jako saprotrofní organismy nebo vytvářet řadu symbiotických vztahů s ostatními organismy. Kromě toho, že mohou být rostliny kolonizovány půdními patogeny, kořeny mnoha rostlinných druhů jsou osídleny nepatogenními či mutualistickými mikroorganismy, jako jsou mykorhizní či endofytické houby. Tyto houby poskytují různé výhody svým partnerským rostlinám, včetně lepšího přístupu k minerálním živinám a efektivnější obrany před herbivorií a patogenními organismy. Rostliny jsou primárními producenty v terestrických ekosystémech. Velká část fotosynteticky fixovaného uhlíku je transportována vodivými pletivy rostliny do kořenů a dále je určité množství regulovaně předáno mykorhizním houbám (Courty et al., 2010). Uhlík se dostává do okolní půdy buďto ve formě uhlíkatých látek exudovaných živým myceliem nebo dekompozicí odumřelé houbové biomasy (nekromasy) (Cairney, 2012).

Význam příspěvku živin do ekosystémů skrze dekompozici houbové nekromasy byl dříve opomíjen, jelikož se předpokládalo, že se jedná o řádově nižší množství než u rostlinného opadu. V posledních letech díky novým studiím se na tento dynamický proces pohlíží jako na významný příspěvek k cyklu uhlíku a tvorbě půdní organické hmoty (Clemmensen et al., 2015; Clemmensen et al., 2013). Je nezbytné pochopit faktory ovlivňující dekompozici houbové nekromasy k pochopení celkového fungování ekosystémů.

Dekompozice houbové nekromasy vykazuje dvoufázovou kinetiku. To znamená, že nastává rychlá iniciační fáze, při níž dochází k rozkladu snadno degradovatelných látek. Iniciační fáze je následována pomalejším rozkladem perzistentní frakce, která může mít důležitou roli v sekvestraci uhlíku v půdě (Brabcova et al., 2016). Pro rozklad perzistentní frakce může být důležitý zdroj snadno dostupné energie například ve formě kořenových exudátů rostlin (tzv. priming effect).

Na rychlost dekompozice houbové nekromasy má vliv mnoho faktorů. Mezi vnitřní faktory patří zejména složení buněčné stěny, morfologie mycelia, ale také

produkce různých sekundárních metabolitů. Mezi nejdůležitější vnější faktory patří komunita mikrobiálních dekompozitorů a klimatické podmínky prostředí (Fernandez et al., 2016).

Vzhledem k rozsahu probíhající klimatické změny, která se dotýká všech ekosystémů naší planety, je důležité určit, jak hlavní faktory klimatické změny ovlivňují půdní mikroorganismy, které zastávají významné ekosystémové služby (Vetrovsky et al., 2019). Klimatická změna může mít významný vliv na ekosystémové procesy. Rozklad houbové nekromasy může být ovlivněn změnami v mikrobiálních komunitách nebo vyšší aktivitou rostlin v důsledku zvýšené koncentrace oxidu uhličitého (CO₂) v atmosféře, což může ovlivnit bilanci uhlíku v půdě. Změny ve struktuře mikrobiálního společenstva v půdě v důsledku klimatické změny je důležitým aspektem pochopení komplexního fungování ekosystémů a predikce změn ekosystémových procesů.

1 Literární přehled

1.1 Koloběh uhlíku

Primární produkce ekosystémů je zajišťována autotrofními organismy, které jsou schopné za pomoci zdroje energie vytvářet organické sloučeniny z jednoduchých látek, jako je CO_2 a voda. V terestrických (suchozemských) ekosystémech jsou to především rostliny. Rostliny jsou schopné fixovat plynný CO_2 z atmosféry procesem, který se nazývá fotosyntéza. Následně je tento uhlík využit pro produkci rostlinné biomasy. Po odumření rostlinného těla vzniká nadzemní a podzemní opad (nekromasa), který je důležitým zdrojem živin v prostředí. Dekompozice rostlinné nekromasy zahrnuje různé fyzikální, chemické a biologické mechanismy. Dekompozice se účastní různé půdní organismy, především pak bakterie, houby a půdní fauna (Aerts, 1997). Půdní mikroorganismy používají pro dekompozici organických substrátů extracelulární enzymy, čímž dochází k mineralizaci substrátu, spojené s uvolňováním živin, které mohou být následně využity rostlinami a jinými půdními mikroorganismy. Dekompozice snadno rozložitelných substrátů se účastní bakterie i houby. Houby jsou považovány za hlavní dekompozitory z důvodu své schopnosti produkovat širokou škálu extracelulárních enzymů, jimiž dokáží degradovat perzistentní komponenty rostlinné nekromasy. Houby mají oproti bakteriím výhodu ve formě apikálně rostoucích hyf, jimiž dokáží kolonizovat větší půdní plochu, kde jsou živiny rozloženy heterogenně (de Boer et al., 2005). Bakterie představují další důležitou, i když méně prozkoumanou, součást mikrobiální komunity v půdách. Recentní studie přicházejí se zjištěním, že bakterie produkují enzymy degradující komponenty buněčné stěny rostlin, čímž se významnou měrou podílejí na dekompozici rostlinné nekromasy (Berlemont a Martiny, 2015; Brown a Chang, 2014; Lopez-Mondejar et al., 2016). Během dekompozice organické hmoty se velká část vázaného uhlíku uvolňuje ve formě CO_2 do atmosféry. Dynamika dekompozice rostlinné nekromasy je důležitým faktorem, který určuje, jaké množství CO_2 bude uvolněno do atmosféry a jaké množství bude uloženo ve formě půdní organické hmoty (POM) (Lal, 2004). Nízká rychlost dekompozice vede k tvorbě zásob organické hmoty v půdě, naopak vyšší rychlost dekompozice vede k uvolňování živin a CO_2 do prostředí (Isaac a Nair, 2005).

Ekosystémové procesy jsou velmi citlivé na změny klimatu (Piao et al., 2013; Wang et al., 2014). Jedním z podstatných důkazů probíhající klimatické změny bylo měření koncentrace atmosférického CO_2 v druhé polovině minulého století na stanici

Mauna Loa na ostrově Havaj (Keeling et al., 1976). Byl zaznamenán vliv sezonality na vývoj koncentrace CO₂ během roku. Dále bylo zaznamenáno postupné zvyšování koncentrace CO₂ v atmosféře z roku na rok. Při zahájení měření na stanici Mauna Loa se koncentrace CO₂ pohybovala kolem 315 ppm (z latinského *parts per milion*). V roce 2014 byla překročena hranice 400 ppm. Současná míra nárůstu je přibližně 2 ppm za rok (Ciais et al., 2013).

Nárůst koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, především pak CO₂, je velmi pravděpodobně způsoben lidskou činností (Oreskes, 2004). Dle současných modelů další emise CO₂ nevyhnutelně povedou k pokračujícímu oteplování planety v průběhu 21. století (Meehl et al., 2006). V posledních letech byla věnována zvýšená pozornost možným reakcím a zpětnovazebným mechanismům v terestrických a mořských ekosystémech v souvislosti probíhající klimatické změny (Plattner et al., 2008). Zpětná vazba může být pozitivní nebo negativní. Zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře vede k většímu příjmu CO₂ terestrickými i mořskými ekosystémy, což je silná negativní zpětná vazba, jelikož vede ke zmírnění nárůstu CO₂ v atmosféře. Naopak zvýšená teplota vede ke zvýšené respiraci a uvolňování uhlíku z půdy a oceánu v formě CO₂ do atmosféry, což je pozitivní zpětná vazba, jelikož to vede k dalšímu nárůstu koncentrace CO₂ v atmosféře. Přesné pochopení bilance mezi zvýšenou fixací CO₂ a zvýšenou rychlostí dekompozice (a tudíž i půdní respirace) způsobené klimatickými změnami umožní přesnější predikci dalšího vývoje klimatu na planetě.

1.2 Půdní organická hmota

Půdní organická hmota (POM) je primárním zdrojem živin v terestrických ekosystémech a značným zásobníkem uhlíku. Půda obsahuje dvakrát více uhlíku než atmosféra a vegetace dohromady. Z půdy se ročně uvolní 60 – 75 Pg uhlíku do atmosféry skrze dekompozici organického materiálu aktivitou půdních organismů (Schlesinger a Andrews, 2000). Rozklad a tvorba POM jsou základními ekosystémovými procesy pro určení zásob uhlíku v půdě. Dříve se předpokládalo, že většina uhlíku ve stabilní frakci POM je přímo odvozena z rostlinné nekromasy, ale nyní se již ví, že podstatná část uhlíku je odvozena od mikrobiální nekromasy (Cotrufo et al., 2013; Godbold et al., 2006). Rostlinná nekromasa obsahuje různé organické sloučeniny, mezi něž patří komponenty buněčné stěny rostlin, především pak celulóza, hemicelulózy a lignin. Tyto látky ovlivňují průběh dekompozice rostlinné nekromasy (Swift et al., 1979). Celulóza je složena

z glukanu spojených β -1,4-glykosidickou vazbou, přičemž se tvoří dlouhé nerozvětvené řetězce, které nejsou rozpustné ve vodě. Množství celulózy v rostlinném opadu se pohybuje mezi 10 – 50 %. Poměr hemicelulóz k celulóze se pohybuje od 0,7 do 1,2 v závislosti na typu rostliny (Fengel a Wegener, 1989). Lignin může představovat 15 – 40 % z celkového množství rostlinné nekromasy. Rychlost dekompozice rostlinné nekromasy se může lišit v závislosti na kvalitě opadu. Obsah dusíku a špatně rozložitelného ligninu jsou významnými faktory, které regulují rychlost dekompozice rostlinné nekromasy (Gartner a Cardon, 2004).

Biomasa živých půdních mikroorganismů představuje jen 1 – 3 % obsahu uhlíku v POM, ale obrát živé biomasy v nekromasu je velmi rychlý a přispívá v tvorbě POM významnou měrou. Z tohoto důvodu je dekompozice mikrobiální nekromasy nyní považována za určující faktor tvorby a stabilizace POM (Cotrufo et al., 2013; Schmidt et al., 2011). Mikrobiální nekromasa může reprezentovat více než polovinu (50 – 80 %) rozpustné části POM a obsahovat více než 80 % dusíku v půdě (Simpson et al., 2007).

Dekompozice nekromasy symbiotických hub zasluhuje zvláštní pozornost, jelikož tyto houby obývají rozhraní mezi kořeny rostlin a půdou a řídí klíčový proces vstupu fotosynteticky fixovaného uhlíku do rhizosféry. Mykorhizní houby představují nezanedbatelnou část celkové půdní mikrobiální nekromasy, obzvláště pak v lesích mírného pásma a boreálních lesích (Cotrufo et al., 2013; Schmidt et al., 2011). Více než polovina (50 – 70 %) uhlíku, který je akumulován v organickém horizontu půdy boreálních lesů, je původem z rostlinných kořenů a mikroorganismů, které jsou s kořeny rostlin asociované (Clemmensen et al., 2013).

Identifikace a hlubší pochopení dominantních procesů tvorby a stabilizace POM je nezbytná pro porozumění cyklu živin a predikci zpětnovazebných mechanismů v kontextu probíhající klimatické změny.

1.3 Dekompozice houbové nekromasy

Dekompozici houbové nekromasy mohou ovlivňovat různé faktory, které můžeme rozdělit na vnitřní a vnější. Mezi vnitřní faktory patří složení buněčné stěny hub, morfologie mycelia a produkce různých sekundárních metabolitů. Mezi důležité vnější faktory patří mimo jiné klimatické podmínky, dostupnost jednoduchých uhlíkatých látek mikroorganismům (priming effect) a složení komunity mikroorganismů v prostředí, která se účastní dekompozice substrátu.

1.3.1 Vnitřní faktory

1.3.1.1 Složení buněčné stěny hub

Pro rychlost dekompozice jsou velice důležité vlastnosti houbové nekromasy, zejména koncentrace limitujících minerálních živin či výskyt struktur rezistentních k dekompozici. Dvacet až padesát procent biomasy hub je uloženo v jejich buněčné stěně. Konkrétní množství je však závislé na mnoha faktorech (Bowman a Free, 2006; Feofilova, 2010). Komponenty buněčné stěny hub mají své vzdálené analogy v buněčné stěně rostlin (viz. následující podkapitoly). Při senescenci mycelia rychle klesá obsah cytoplazmy v buňkách, takže rychlost dekompozice pravděpodobně významně neovlivňuje (Saltarelli et al., 1998). Z toho vyplývá, že složení buněčné stěny hub (Tab. 1) je pro rychlost dekompozice houbového mycelia zcela klíčovým faktorem. Obsah jednotlivých prvků v buněčné stěně se liší napříč druhovým spektrem hub, což může významně ovlivňovat rozdíl v dekompozici mezi jednotlivými druhy hub.

Tabulka č. 1: Obecný přehled komponent buněčné stěny hub, obsažených živin a typu enzymů, jež se podílejí na degradaci makromolekul na asimilovatelné substráty. (Podle Fernandez et al., 2016)

Substrát	Zdroj živin	Enzymy účastnící se degradace
Glukany	C	Hydrolytické
Chitin	C, N	Hydrolytické
Proteiny	C, N	Hydrolytické
Melaniny	C	Oxidativní

1.3.1.1.1 Glukany

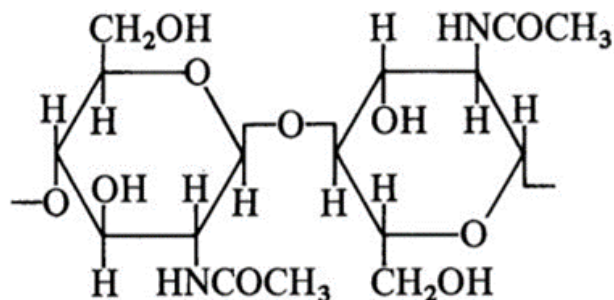
Polysacharidy obecně představují 80 – 90 % sušiny buněčné stěny hub (Bartnick, 1968). Mezi polysacharidy buněčné stěny patří především glukany, které jsou složeny z monomerů glukózy spojených α nebo β glykosidickou vazbou. Většina glukanů tvoří lineární polymery nerozpustné ve vodě. Houbové glukany obsahují převážně lineární β -(1,3)-glykosidickou vazbu a minoritní část tvoří glukany s β -(1,6)- a β -(1,4)-glykosidickou vazbou. Glukany jsou nejhojnější složkou buněčné stěny znatelného počtu druhů hub bez ohledu na jejich taxonomickou příslušnost (Bowman a Free, 2006).

Dekompozice glukanů se účastní stejné hydrolytické enzymy, které se účastní dekompozice rostlinné celulózy. Glukany, stejně jako celulóza, mohou interagovat

s dalšími komponentami buněčné stěny hub – chitinem a melaniny – a mohou tak ovlivňovat biochemické vlastnosti buněčné stěny, a tím negativně ovlivňovat její rozložitelnost (Treseder a Lennonb, 2015). β glukany mohou zvyšovat kapacitu zadržování vody, a tím zvyšovat rychlost dekompozice nekromasy v prostředí, kde je voda limitujícím faktorem (Kyanko et al., 2013). Vliv koncentrace glukánů a jejich uspořádání na rychlost dekompozice mycelií hub však stále není jasný.

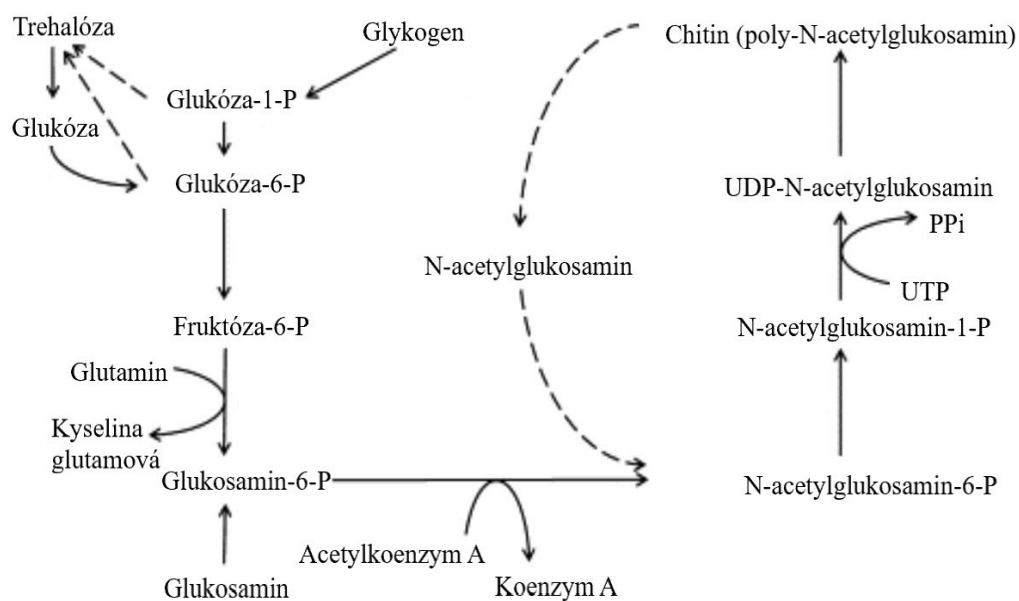
1.3.1.1.2 Chitin

Chitin je důležitý strukturní polysacharid buněčné stěny hub, který je složen z monomerů N-acetylglukosaminu, jež jsou spojeny β -(1,4)-glykosidickou vazbou (Obr. 1). Po celulóze je chitin druhou nejrozšířenější organickou sloučeninou na Zemi a je syntetizován širokou škálou organismů různé taxonomické příslušnosti. Na rozdíl od celulózy však chitin představuje i zdroj dusíku. Chitin slouží primárně ke stabilizaci buněčné stěny hub.



Obrázek č. 1: Struktura molekuly chitinu (Podle Cohen, 2001)

Biosyntéza chitinu (Obr. 2) je evolučně konzervovaný proces začínající biotransformací cukrů, jako je trehalóza nebo glukóza, která zahrnuje fosforylaci a aminaci substrátu. Další kroky biosyntézy chitinu zahrnují přenos zbytků N-acetylglukosaminu z univerzálního donora, což je uridindifosfát N-acetylglukosamin, do rostoucího řetězce polymeru. Reakce je katalyzována enzymem chitin syntáza, jehož aktivita je pro biosyntézu chitinu klíčová (Cohen, 2001). Řetězce jsou následně vylučovány do extracelulárního prostoru, shromážděny do mikrofibril a organizovány do buněčné stěny. U hub jsou tohoto procesu schopny vegetativní a sporující buňky (Lesage a Bussey, 2006).



Obrázek č. 2: Biosyntetická dráha vedoucí ke vzniku chitinu (Upraveno podle Merzendorfer, 2011)

Obsah chitinu v buněčných stěnách ektomykorhizních (EcM) hub je obvykle 1 - 10 % sušiny (Fernandez a Koide, 2012). Chitin se v buněčné stěně nevyskytuje sám, ale většinou je v komplexu s dalšími komponentami buněčné stěny jako jsou glukany, proteiny a melaniny. Tvorba takových komplexů může vést k rozdílné dynamice rozkladu chitinu v buněčné stěně a purifikovaného chitinu (Bartnick, 1968). Některé starší studie prezentovaly špatnou rozložitelnost chitinu v houbové nekromase a jeho přetrvávání v POM (Godbold et al., 2006; Treseder a Allen, 2000).

Novější studie přišly s opačnými výsledky. Chitin je substrát bohatý na dusík, a proto je rozklad nekromasy poháněn limitací dusíkem v prostředí (Fernandez a Koide, 2012; Russell, 2014). Houby i bakterie produkují extracelulární enzymy, které se nazývají chitinázy. Tyto enzymy hydrolyzují glykosidickou vazbu v polymeru chitinu a zpřístupňují jednoduchý substrát k dalšímu rozkladu (Gray a Baxby, 1968).

Obsah chitinu v buněčné stěně hub pozitivně přispívá ke kvalitě opadu. Formy dusíku, které rozkladači přijmou dekompozicí chitinu, jsou velmi výhodné, protože houby mohou inkorporovat přímo glukosamin do své buněčné stěny. Tím se vyhnou energeticky náročnému kroku v dráze biosyntézy chitinu (Trofymow et al., 1983).

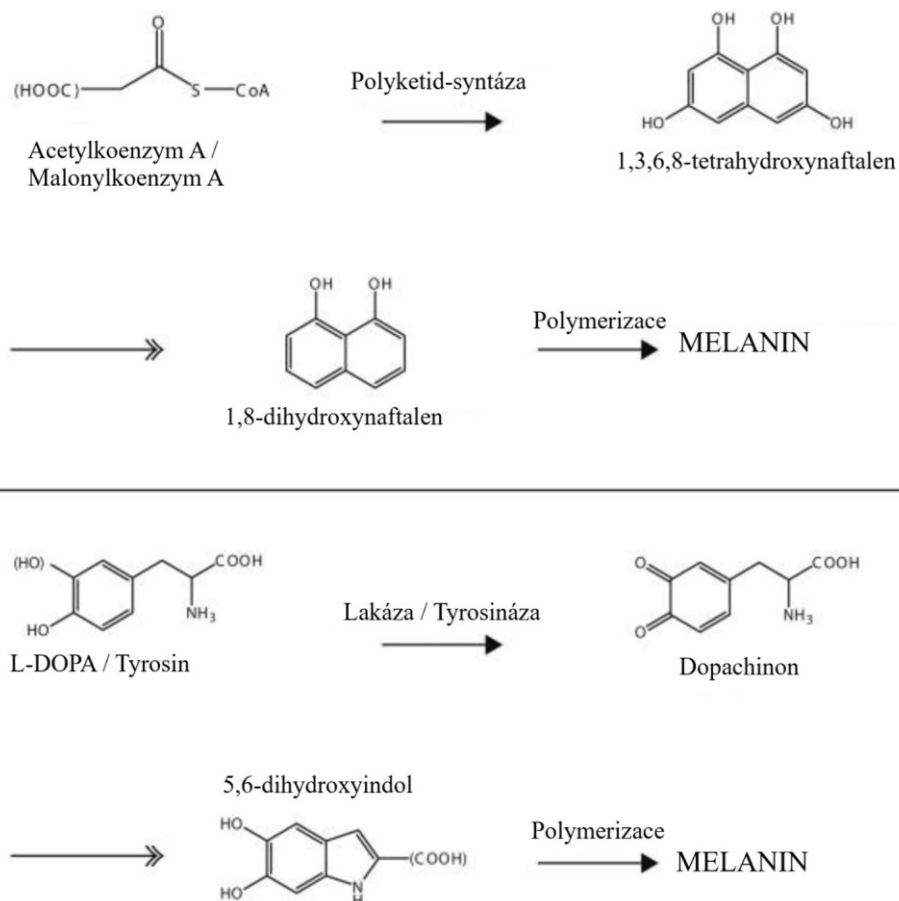
1.3.1.1.3 Melanin

Melaniny jsou komplexní aromatické biopolymery složeny z monomerů fenolu či indolu, které tvoří nepravidelné struktury (Bell a Wheeler, 1986). Chemická struktura melaninů není příliš prozkoumána.

Melanin obecně přispívá k toleranci stresových podmínek (Fernandez a Koide, 2013; Kejzar et al., 2013; Kogej et al., 2007; Rosas a Casadevall, 1997; Wang a Casadevall, 1994). Z čehož plyne, že podmínky prostředí předurčují výskyt melanizovaných druhů hub.

V houbách existují dvě dráhy syntézy melaninu (Obr. 3). Při syntéze drahou dihydroxynaftalen (DHN) se endogenně produkuje prekurzorová molekula acetylkoenzym A nebo malonylkoenzym A. Prvním krokem je tvorba 1,3,6,8-tetrahydroxynaftalenu, která je katalyzována enzymem polyketid-syntáza. Polyketid-syntáza patří do velké rodiny enzymů, které se účastní tvorby sekundárních metabolitů, jako jsou pigmenty, toxiny, antibiotika a signální molekuly. Dále dochází k řadě redukčních a dehydratačních reakcí, jejichž finálním produktem je DHN. Polymerizací DHN vzniká melanin (Butler a Day, 1998).

Některé houby syntetizují melanin skrze 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Tato dráha se podobá biosyntéze melaninu u savců. Jako prekurzorová molekula slouží L-DOPA nebo tyrosin. Pokud je prekurzorem L-DOPA, je oxidován enzymem lakáza na dopachinon. Pokud je prekurzorem tyrosin, je nejprve převeden na molekulu L-DOPA a poté na dopachinon, přičemž oba kroky zajišťuje enzym tyrosináza. Dopachinon je velmi reaktivní molekula. Následuje řada reakcí, jejichž finálním produktem je dihydroxyindol, jehož polymerizací vzniká melanin (Riley, 1997).



Obrázek č. 3: Srovnání dráhy syntézy melaninu drahou dihydroxynaftalen (DNH; horní) a 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA; spodní)

V dráze DNH je prekurzorová molekula – acetylkoenzym A nebo malonylkoenzym A – substrátem enzymu polyketidsyntázy. K výrobě DNH (1,8-dihydroxynaftalen), což je podjednotka polymeru melaninu, je zapotřebí několik enzymatických kroků. V dráze L-DOPA je prekurzorová molekula – L-DOPA nebo tyrosin – substrátem enzymu lakázy nebo tyrosinázy. Pro výrobu dihydroxyindolu, což je podjednotka polymeru melaninu, je zapotřebí několik enzymatických kroků. (Upraveno podle Eisenman a Casadevall, 2012)

Melanin, stejně jako rostlinný lignin, nemůže být rozložen hydrolytickými enzymy, protože neobsahuje žádné specifické vazebné místo. Melanin a lignin podléhají katabolismu pouze za přítomnosti nesespecifických oxidativních enzymů, jejichž produkce je pro mikroorganismy energeticky velmi náročná a navíc je důležitá dostupnost kyslíku. Tato skutečnost předurčuje melanizované hyfy k pomalejší dekompozici a perzistenci v půdě. Melanizace mycelia tedy přispívá k sekvestraci uhlíku v POM (Clemmensen et al., 2015; Fernandez a Kennedy, 2018).

Koncentrace melaninu v buněčné stěně se velice liší napříč druhovým spektrem hub. Existují houby hyalinní, které syntetizují jen nepatrné množství melaninu. Na druhou stranu, existují i druhy hub, které jsou velmi bohatě pigmentované, například

Cenococcum geophilum. Bylo experimentálně potvrzeno, že hyalinní houby podléhají dekompozici podstatně rychleji než melanizované houby. Dále bylo potvrzeno, že sám melanin podléhá dekompozici pomaleji než ostatní komponenty buněčné stěny hub (Fernandez a Koide, 2014; Fernandez et al., 2013; Malik a Haider, 1982).

Inhibitor biosyntézy melaninu, tricyklazol, omezuje polymerizaci prekurzorových molekul do struktury melaninu a projeví se jako celkové snížení obsahu uhlíku v buněčné stěně, které vede ke snížení poměru obsahu C:N. Nižší poměr vede k rychlejší dekompozici, obzvláště v ekosystémech s limitací dusíkem. Koncentrace dusíku v buněčné stěně hub tedy pozitivně koreluje s rychlostí dekompozice, kdežto koncentrace melaninu s rychlostí dekompozice koreluje negativně (Fernandez a Kennedy, 2018; Fernandez a Koide, 2014; Fernandez et al., 2013).

V roce 2018 byla studována melanizovaná a hyalinní mycelia u houby *Meliniomyces bicolor*, která je pro tyto účely vhodná z důvodu možnosti změny obsahu melaninu bez použití chemických inhibitorů, což umožňuje přímé porovnání melanizované a hyalinní nekromasy u stejného druhu houby. Ztráta hmotnosti během dekompozice hyalinního mycelia byla velmi rychlá. Během prvního měsíce inkubace došlo v průměru ke ztrátě 73 % materiálu. U melanizovaného mycelia došlo za první měsíc inkubace ke ztrátě v průměru 51 % materiálu. Celá inkubace trvala tři měsíce, přičemž během celého tohoto období se melanizované mycelium rozkládalo významně pomaleji než hyalinní (Fernandez a Kennedy, 2018).

V roce 2019 byla publikována jedna z prvních studií sledující dekompozici houbové nekromasy během delšího časového úseku. Pro terénní experiment byly použity čtyři různé houbové izoláty, které se lišily úrovní melanizace. Ukázalo se, že po rychlé iniciační fázi (tři měsíce v tomto konkrétním experimentu) rozkladu nastává fáze stabilizace. U všech použitých houbových izolátů tento bod stabilizace nastal, když hmotnost zbývající nekromasy odpovídala zjištěnému počátečnímu obsahu melaninu v materiálu. To pravděpodobně ukazuje, že hydrolyzovatelná frakce již byla rozložena a v materiálu pravděpodobně zůstala perzistentní frakce, která byla reprezentována především melaninem. Toto experimentální zjištění je v rozporu s hypotézou, která tvrdí, že by melanin tvořil komplexy s ostatními komponentami buněčné stěny. Jedná se o první experimentální zjištění tohoto typu a pro úplné potvrzení je potřeba dalšího výzkumu (Fernandez et al., 2019).

1.3.1.1.4 Proteiny

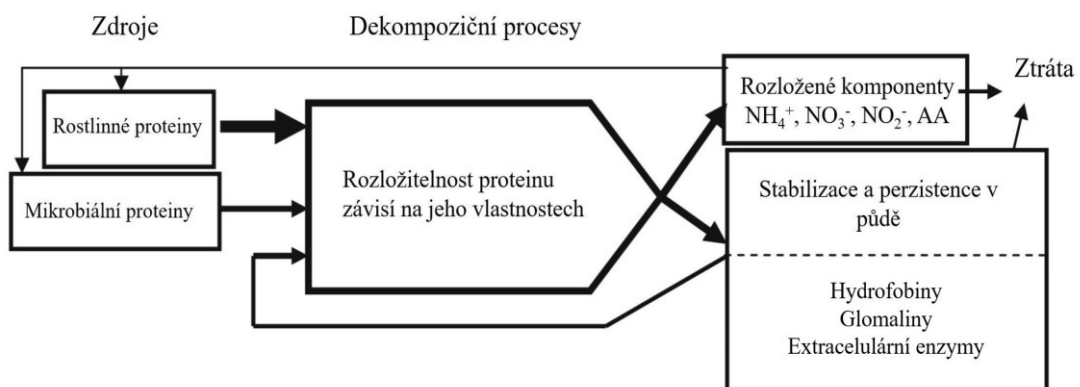
Proteiny jsou důležitou strukturální komponentou buněčné stěny hub. Představují cca 15 – 30 % sušiny, přičemž hodnota je mezi druhy hub variabilní (Christias et al., 1975). Proteiny se nejběžněji vyskytují ve formě glykoproteinů se strukturální i signalizační funkcí (Bowman a Free, 2006).

Proteiny, stejně jako jakákoli jiná organická látka, mohou být degradovány pouze, pokud jsou přístupné extracelulárním enzymům. Všeobecně platí, že proteiny podléhají dekompozici rychle, jelikož jsou hydrolyzovatelné. Zároveň je rozklad poháněn limitací dusíkem v ekosystému, protože proteiny představují významný zdroj dusíku (Bowman a Free, 2006; Kogel-Knabner, 2002; Smiderle et al., 2012). Cyklus proteinů v půdě je zobrazen na obrázku č. 4.

Výjimkou z obecného předpokladu jsou hydrofobiny, což jsou hydrofobní proteiny bohaté na aminokyselinu cystein. Hydrofobiny produkují ektomykorhizní (EcM) houby z oddělení *Basidiomycota* a *Ascomycota* (Rillig et al., 2007). Tyto houby mají mnoho genů pro hydrofobiny, přičemž proteiny plní různé funkce. Hydrofobiny jsou asi 100 aminokyselin dlouhé a mohou představovat až 10 % celkových buněčných proteinů. Jednotlivé hydrofobiny hub si nejsou příliš podobné, ale sdílí osm konzervovaných cysteinových zbytků (Wosten, 2001). Hydrofobiny se organizují do amfipatické proteinové struktury na rozhraní hydrofilního a hydrofobního prostředí, jako je například přechod mezi vodou a vzduchem. Umožňují vláknitým houbám překonat rozhraní vody a vzduchu tím, že snižují povrchové napětí vody. Hydrofobiny jsou lokalizované vně buněčné stěny hub a patrně přispívají k ochraně organismu před neúměrnou vlhkostí. Dále zprostředkovávají připojení hub k hydrofobním povrchům (Wosten a de Vocht, 2000). Hydrofobiny svými vlastnostmi přispívají ke stabilizaci a perzistenci uhlíku a dusíku v půdě (Rillig et al., 2007).

Další proteiny relativně odolné k dekompozici jsou glomaliny, což jsou glykoproteiny produkované arbuskulárně mykorhizními (AM) houbami z oddělení *Glomeromycota*. Je známa role glomalinu při tvorbě a stabilizaci agregátů v půdě, z důvodu jeho hydrofobní struktury, která je navíc schopná vázat kovy (Wu et al., 2014). Aktivita glomalinů může snižovat obrát POM a zvýšit její sekvestraci v terestrických ekosystémech. Na rozdíl od předpokládané role v půdní ekologii je funkce glomalinu v biologii a fyziologii AM hub méně jasná. Byla navržena hypotéza, která předpokládala, že glomalin má stejnou funkci jako hydrofobiny (Driver et al., 2005; Rillig et al., 2007).

Sekvence genu pro glomalin později odhalila, že se nejedná o hydrofobin, ale pravděpodobně jde o homolog Heat shock protein 60 (Hsp60). Hsp jsou typicky multifunkční proteiny a sekvenční homologie nemusí nutně předurčovat podobnou funkci (Gadkar a Rillig, 2006). Při použití metody transmisní elektronové mikroskopie na studium mycelia houby *Glomus intraradices* se zjistilo, že je glomalin lokalizován spíše ve vnitřní části buněčné stěny. Vzhledem k tomu, že buněčná stěna představuje rozhraní s půdním prostředím, je pravděpodobné, že se protein podílí na procesech, jako je interakce s půdní biotou a půdními povrchy (Purin a Rillig, 2008). Funkce i význam glomalinu ve fyziologii AM hub zůstává nadále neznámý. Výzkum se soustředí především na roli glomalinu v ekologii půdy.



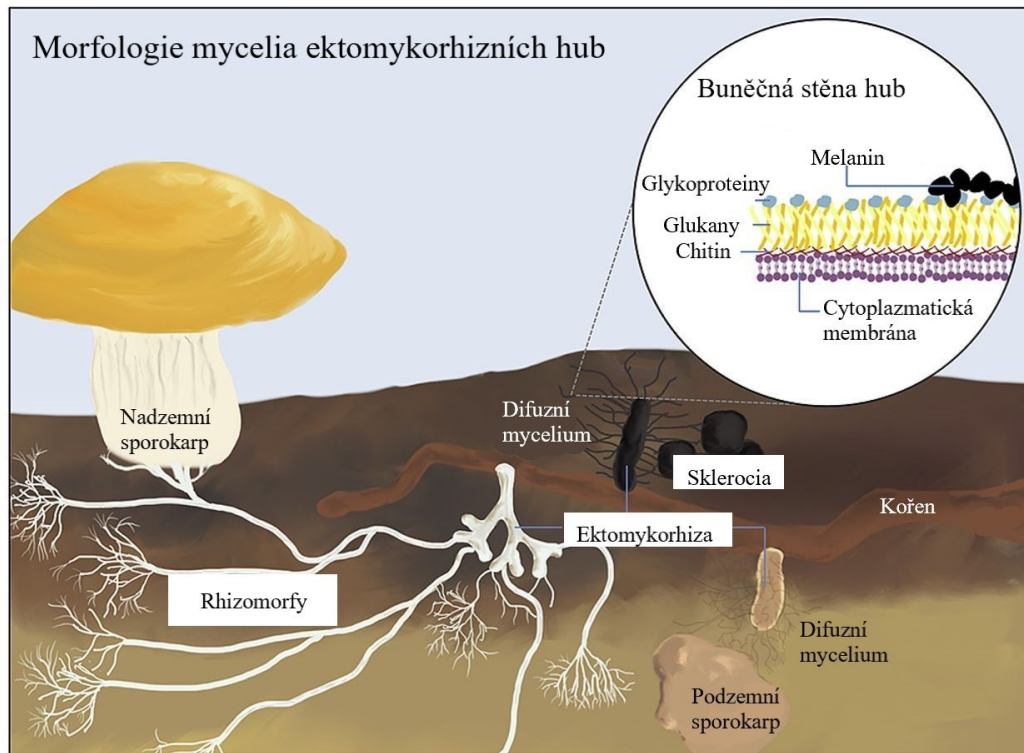
Obrázek č. 4: Cyklus proteinů v půdě

Proteiny v půdě pochází od různých zdrojů a mohou být buďto rozloženy na jednoduché komponenty nebo stabilizovány v půdě. Perzistentní proteiny jsou opakovaně vystavovány dekompozičním procesům. Jakmile se stanou přístupné pro extracelulární enzymy rozkladačů, dojde k jejich dekompozici. (Upraveno podle Rillig et al., 2007)

1.3.1.2 Morfologie mycelia

Většina hub produkuje difuzní mycelium, pokud rostou v prostředí, kde jsou živiny homogenně distribuovány, což odpovídá podmínkám laboratorní kultivace hub. To je hlavní důvod, proč se výzkum soustředí především na rozklad difuzního mycelia (Fernandez a Koide, 2012; Koide a Malcolm, 2009; Koide et al., 2011). V přirozeném prostředí jsou zdroje rozprostřeny většinou heterogenně, a proto houby tvoří rhizomorfní struktury, které jsou výhodnější pro exploraci okolí na delší vzdálenosti. V přírodě tvoří houby rozdílné morfologické struktury pro různé další funkce, části životního cyklu, interakce s okolím a podobně (Obr. 5). Každá tato struktura má potenciál ovlivňovat

dekompoziční procesy (Fernandez et al., 2016). Vliv morfologie mycelia na dekompozici houbové nekromasy zůstává z velké části neznámý.



Obrázek č. 5: Schématické zobrazení morfologických struktur mycelia ektomykorhizních hub v přirozeném prostředí (Upraveno podle Fernandez et al., 2016)

Několik studií se již věnovalo odhadu doby perzistence houbových rhizomorfních struktur v půdách. Odhadované rozmezí se pohybuje od několika měsíců do více než jednoho roku (McCormack et al., 2010; Treseder et al., 2005; Vargas a Allen, 2008). Tato zjištění kontrastují s odhady doby perzistence difuzního mycelia v půdách, které jsou v řádu týdnů (Allen a Kitajima, 2013; Hagenbo et al., 2018). Tyto rozdíly v odhadech naznačují, že morfologie houbové nekromasy může hrát velmi významnou roli při určování rychlosti dekompozice houbové nekromasy (Brabcova et al., 2016; Fernandez et al., 2016).

Na dekompozici rhizomorfních struktur nebylo prozatím provedeno mnoho experimentálních studií. Studie z roku 2007, která se zabývala dekompozicí rhizomorfních struktur houby *Armillaria lutea*, uvádí, že po deseti týdnech inkubace v půdě zbylo 70 % materiálu a po 30 týdnech inkubace zbylo 50 % materiálu. Tato studie

poskytuje vhléd do problematiky, ale nepřináší porovnání rychlosti rozkladu mezi difuzním myceliem a rhizomorfními strukturami (Lamour et al., 2007).

První studie, která se přímo zaměřuje na vliv morfologie mycelia na dekompozici houbové nekromasy, vyšla v roce 2018. Bylo vykultivováno difuzní mycelium i rhizomorfní materiál stejného houbového izolátu *Armillaria mellea* a vzniklá nekromasa byla použita pro porovnání rychlosti rozkladu. Po dvanácti týdnech inkubace v půdě zbylo 8 % materiálu difuzního mycelia a 45 % materiálu rhizomorfní nekromasy. Bylo tedy prokázáno, že morfologie mycelia má významný vliv na rychlost rozkladu houbové nekromasy (Certano et al., 2018). Snížená rychlost dekompozice rhizomorfních struktur může být způsobena celou řadou faktorů, mezi něž může patřit vysoká koncentrace nesenadno rozložitelných struktur, nízký obsah dusíku, vysoká koncentrace krystalů oxalátu (Crowther et al., 2015) a hydrofobní povaha povrchu struktur (Certano et al., 2018).

Mnoho saprotrofních a mykorhizních hub produkuje rhizomorfní struktury, a proto pro zasazení poznatků o rozdílech rychlosti rozkladu do kontextu celého ekosystému musí být uvážén poměr obsahu difuzního mycelia a rhizomorfních struktur v půdách různých ekosystémů (Certano et al., 2018). V tomto směru je potřeba dalšího výzkumu nezbytná.

1.3.1.3 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity zahrnují velké množství produktů biologické činnosti. Houby produkují celou řadu sekundárních metabolitů, které mají často silné fyziologické účinky. Všechny produkované látky mají potenciál ovlivňovat dekompoziční procesy. Tyto nízkomolekulární látky zajišťují širokou škálu různých funkcí, ale velká část z nich je zapojena do inhibice růstu ostatních hub a bakterií (Keller et al., 2005).

Některé mykorhizní houby jsou známé pro svou schopnost ochránit své hostitelské rostliny před patogeny právě díky antimikrobiálním sekundárním metabolitům, které produkují (Adeoyo et al., 2019; Nagy a Fossdal, 2013). Je logické předpokládat, že pokud tyto antimikrobiální metabolity přetrvávají i po odumření houby v houbové nekromase, tak je velmi pravděpodobné, že to zapříčiní inhibici dekompozice této nekromasy (Fernandez et al., 2016). Momentálně ale neexistuje žádná experimentální studie, která by tento předpoklad v souvislosti s rozkladem houbové nekromasy potvrdila nebo vyvrátila.

Houby produkují mimo antibiotických látek i celou řadu látek volatilních, které mohou inhibovat růst dekompozitorů v blízkosti hub mykorhizních, které tyto látky produkují ve velkém množství (Napoli et al., 2010; Pickles et al., 2010). V této oblasti ale rovněž chybí experimentální data.

Ve vzorcích odebraných z půd byla často pozorována akumulace krystalů šťavelanu vápenatého v okolí ektomykorhiz a souvisejících houbových struktur. Některé mykorhizní houby produkují velké množství kyseliny šťavelové, což může působit antimikrobiálně a ovlivňovat růst ostatních hub v rhizosféře. Produkce kyseliny šťavelové způsobí snížení pH v okolní půdě (Rasanayagam a Jeffries, 1992). Z důvodu nízkého pH půdy může poklesnout výskyt dekompozitorů v okolí, a tím zapříčinit sníženou rychlost dekompozice houbové nekromasy (Fernandez et al., 2016). V této oblasti je rovněž nedostatek experimentálních studií, které by se přímo zabývaly vlivem produkce kyseliny šťavelové na rozklad houbové nekromasy.

1.3.2 Vnější faktory

1.3.2.1 Komunita mikroorganismů

Je známo, že složení mikrobiálního společenstva je důležitým faktorem rozkladu rostlinné nekromasy v půdě (Strickland et al., 2009). Mnoho komponent buněčné stěny hub má analogy v buněčné stěny rostlin a tyto látky jsou rozkládány stejnými extracelulárními enzymy (viz 1.3.1). Dekompozice organických látek v půdě se účastní různé půdní organismy, především pak houby, bakterie a půdní fauna (Aerts, 1997). Znalosti v oblasti vlivu komunit dekompozitorů účastníci se degradace houbové nekromasy je v tuto dobu značně omezený v porovnání s rostlinnou nekromasou. Počáteční fázi rozkladu houbové nekromasy obecně dominují r-strategické rychle rostoucí mikroorganismy, které lze považovat za generalisty. Tyto mikroorganismy jsou schopné využít velkou část rozpustných a hydrolyzovatelných látek, které jsou obsaženy v houbové nekromase. V pozdější fázi dekompozice po vyčerpání snadno degradovatelných látek převládají mikroorganismy, které jsou schopné degradovat rekalcitrantní komponenty (Baldrian, 2017; Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018).

1.3.2.1.1 Saprotrofní houby

Saprotrofní houby jsou důležitou součástí půdního mikrobiálního společenstva v terestrických ekosystémech. Dekompoziční aktivita saprotrofních hub přispívá

k důležitým ekosystémovým procesům, jako je cyklus uhlíku a dusíku (Fontaine et al., 2011). Houby jsou tradičně považovány za hlavní dekompozitory organické hmoty z důvodu své schopnosti produkovat extracelulární enzymy, jimiž dokáží degradovat komponenty rostlinné nekromasy, jako je například lignocelulóza, jejíž rozklad je pro jiné organismy obtížný (de Boer et al., 2005). Schopnost saprotrofních hub degradovat rostlinnou nekromasu je dobře zdokumentovaný (Baldrian et al., 2011). Různé druhy hub se liší ve své enzymové vybavenosti a schopnosti degradovat organický materiál (Zhao et al., 2013). Saprotrofní houby z oddělení *Ascomycota* dominují především během počátečních fází dekompozice rostlinné nekromasy. Zastoupení hub z oddělení *Ascomycota* v průběhu dekompozice klesá a jsou v pozdější fázi nahrazeny houbami z oddělení *Basidiomycota*, jejichž zástupci často mají lepší enzymovou vybavenost pro rozklad rekalcitrančních komponent (Osono, 2007). Podobný trend sukcesního vývoje, od hub z oddělení *Ascomycota* na čerstvém substrátu po dominanci druhů hub z oddělení *Basidiomycota*, byl pozorován pro dekompozici houbové nekromasy v lesích mírného pásu a v boreálním lese (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez a Kennedy, 2018).

1.3.2.1.2 Mykorhizní houby

Část hub v průběhu evoluce dokázala navázat symbiotický vztah s rostlinami, vytvořit mykorhizní symbiózu a získávat uhlíkaté látky od svého hostitele. Mykorhizní houby poskytují svým hostitelským rostlinám různé výhody, včetně přístupu k živinám, zlepšení růstu rostlin a příjmu vody či zvýšenou obranu proti herbivorním a patogenním organismům. Mykorhizní symbióza je mutualistický (oboustranně výhodný) vztah mezi rostlinou a houbou, kde houba kolonizuje kořeny hostitelské rostliny, buďto intracelulárně nebo extracelulárně. U řady hub vedl přechod od saprotrofního stylu života k mykorhiznímu k úplné či alespoň částečné ztrátě saprotrofních schopností (Wolfe et al., 2012). Během dlouhé koevoluce rostlin a mykorhizních hub se vyvinulo několik typů mykorhizní symbiózy, které se liší jako anatomicko-morfologickými strukturami, tak organismy, které do těchto symbiotických vztahů vstupují (Brundrett a Tedersoo, 2018). Existuje více typů mykorhizní symbiózy, z nichž tři jsou nejrozšířenější.

Arbuskulární mykorhiza (AM), patřící mezi endomykorhizy, je nejstarší a nejrozšířenější typ mykorhizní symbiózy, kde houby z oddělení *Glomeromycota*

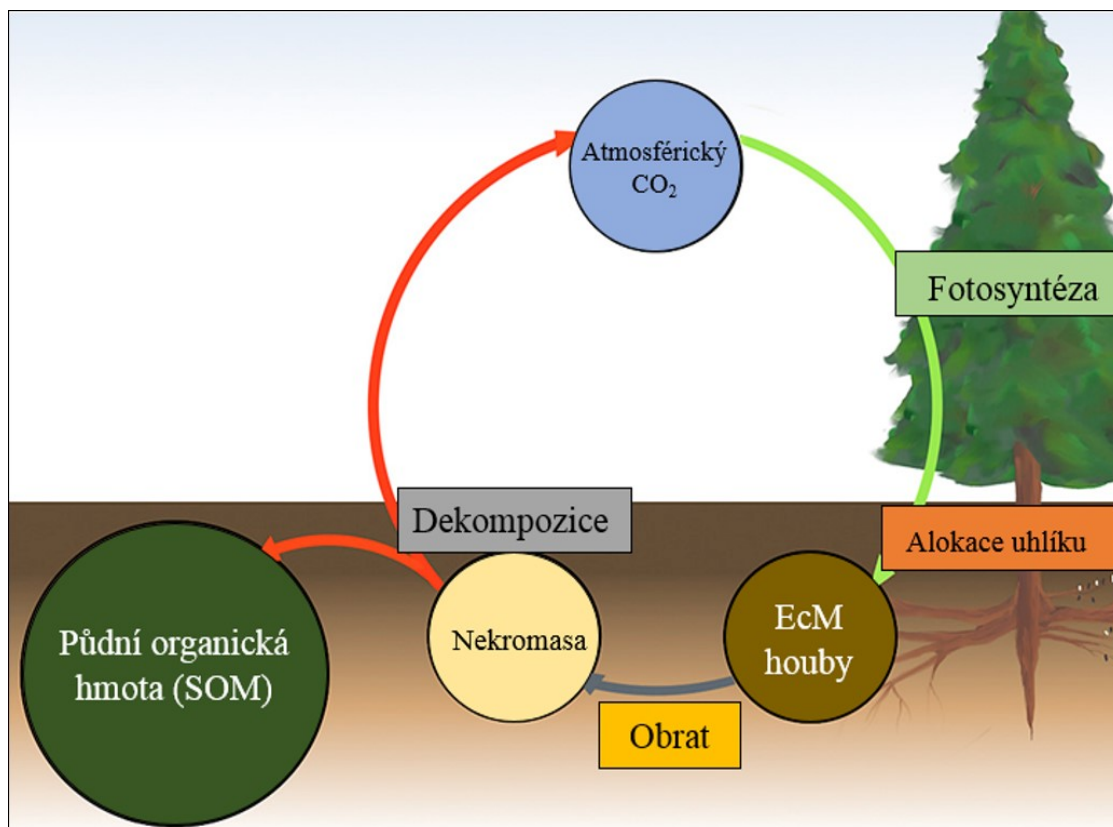
obligátně asociují s rostlinami. Více než 80 % druhů cévnatých rostlin běžně vstupuje do symbiózy s AM houbami (Brundrett a Tedersoo, 2018; Wang a Qiu, 2006).

Ektomykorhizu (EcM) tvoří převážně houby z *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Jen asi dvě procenta cévnatých rostlin vstupuje do EcM symbiózy, ale jsou to ekologicky a ekonomicky důležité stromy a keře, které dominují v lesích mírného pásma, boreálních lesích a některých tropických ekosystémech, což pokrývá obrovský prostor Země (Taylor a Alexander, 2005).

Erikoidní mykorhizu (ErM), patřící mezi endomykorhizy, tvoří rostliny z čeledi *Ericaceae*, které patří do řádu *Ericales*. Přibližně 3400 druhů rostlin vstupují do erikoidní mykorhizy s houbami z oddělení *Ascomycota*, ale prozatím jen jediná houba byla detailně studována (*Rhizoscyphus ericae*). Prokázalo se, že i houby z řádu *Sebacinales*, které náleží do oddělení *Basidiomycota*, mohou běžně tvořit ErM (Selosse et al., 2007). Celkově byla schopnost tvořit ErM prokázána pouze u velmi malého počtu houbových druhů (Kohout, 2017). EcM a ErM jsou oproti AM evolučně mladší (Strullu-Derrien et al., 2018).

Ne všechny rostliny vstupují do mykorhizní symbiózy. Existuje rovněž nemykorhizní stav (NM), který je evolučně velmi mladý a provozuje ho přibližně šest procent druhů rostlin, především v prostředí s extrémními podmínkami (Brundrett, 2009).

Rostliny předávají mykorhizním houbám značnou část (7 – 35 %) fotosynteticky fixovaných uhlíkatých látek (Allen a Kitajima, 2014; Ekblad et al., 2013; Hobbie, 2006; Hobbie a Hobbie, 2006), což činí z mykorhizních hub důležitý sink uhlíku a tedy podstatnou součást globálního cyklu uhlíku (Obr. 6; Courty et al., 2010). Kvantifikace alokace uhlíku mykorhizním houbám je komplikovaná, což činí z tohoto procesu nejistý parametr modelování cyklu uhlíku v ekosystémech. Uhlík, obsažený v biomase téměř všech mykorhizních hub, pochází výhradně od hostitelské rostliny. Tento uhlík se dále dostává do okolní půdy buďto exudací živého mycelia nebo dekompozicí odumřelého mycelia (nekromasy) (Cairney, 2012).



Obrázek č. 6: Koloběh uhlíku v lesních ekosystémech

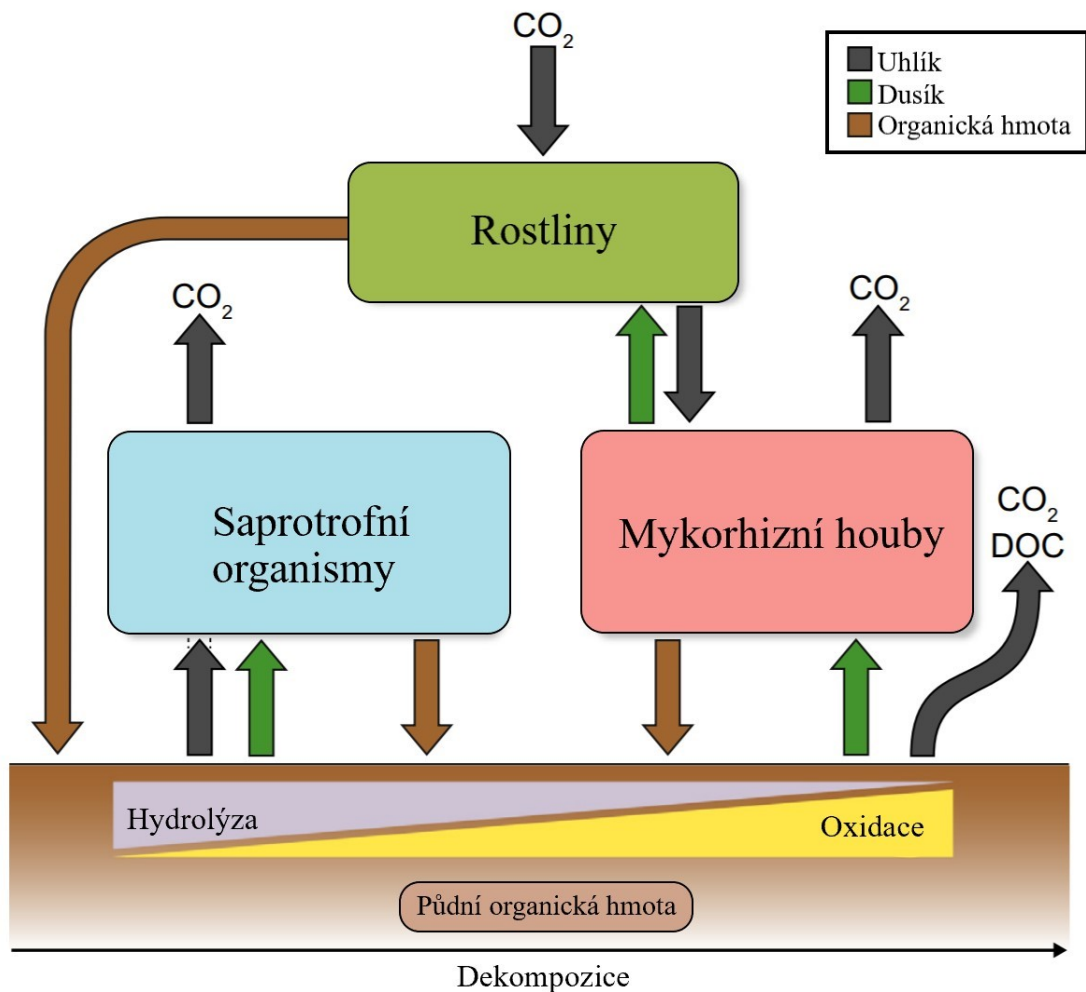
Zelená dráha představuje fixaci uhlíku do fotosyntátu a následnou alokaci EcM houbám. Modrá dráha představuje obrat houbové biomasy. Červená dráha představuje dekompoziční proces, přičemž část je přeměněna až na atmosférický CO₂ a stabilnější komponenty přispívají k tvorbě půdní organické hmoty (POM; Upraveno podle Fernandez et al., 2016)

Je obecně přijímáno, že mykorhiza pomáhá rostlinám v příjmu minerálních živin, které jsou rozpuštěny v půdním roztoku. Dochází k tomu skrze extraradikální (mimokořenové) mycelium, které si lze představit jako prodloužení kořenového systému a zvětšení plochy povrchu, kde může docházet k příjmu živin z půdy. Houby účastníci se ErM nemají tak dobře vyvinuté extraradikální mycelium, ale mají dobrou enzymovou vybavenost, která slouží k uvolňování živin z organického materiálu v půdě (Read et al., 2004).

Mnoho mykorhizních hub má významnou úlohu v uvolňování živin (fosfor a dusík) z organického materiálu, což je velmi důležité zejména v prostředí, kde je většina živin vázána v organickém materiálu (vřesoviště, temperátní a boreální lesy, keříková tundra; Nannipieri a Eldor, 2009). Živiny, které jsou vázány v organickém materiálu, jsou rostlinám přímo nedostupné. Předpokládalo se, že uvolnění živin z organického materiálu účastní výhradně volně žijící saprotrofní organismy. Avšak na konci minulého století bylo diskutováno a prokázáno, že ačkoli EcM houby byly primárně považovány za funkční

prodloužení kořenů rostlin pro získání anorganických forem živin, EcM a ErM houby jsou schopné uvolnit dusík a fosfor z organické hmoty a poskytnout ho svým hostitelským rostlinám (Abuzinadah et al., 1986; Bending a Read, 1995; Read, 1991). Pro uvolnění živin z organického materiálu mají některé EcM houby (např. houby rodu *Cortinarius*) schopnost rozkládat komplexní organické látky pomocí extracelulárních oxidativních enzymů, které slouží k rozkladu fenolických makromolekul jako je například rostlinný lignin (Obr. 7; Bodeker et al., 2014; Rineau et al., 2012). Přístup mykorhizních hub k uhlíku hostitelských rostlin usnadňuje energeticky náročnou degradaci recalcitrantních komplexů, skrze ko-metabolismus. Tento proces je analogický s tzv. priming effect (viz. 1.3.2.3), kdy je rozklad organického materiálu usnadněn dostupností jednoduchých uhlíkatých látek (například nízkomolekulární kořenové exudáty nebo exudáty mykorhizních hub) saprotrofním mikroorganismům (Kuzyakov, 2002). ErM houby se zdají být svou enzymovou vybaveností lepšími rozkladači než EcM houby. V čisté kultuře produkují širokou škálu extracelulárních enzymů (fosfatázy, proteázy, celulázy, oxidázy), které přispívají k rozkladu organické hmoty a uvolňování živin (Read et al., 2004).

Skutečnost, že se mykorhizní houby podílejí na dekompozičních procesech naznačuje, že dochází ke kompetici o limitující živiny mezi saprotrofními a EcM houbami, čemuž se říká Gadgil effect. Předpokládá se, že Gadgil effect vede ke snížení rychlosti rozkladu, což má za následek větší sekvestraci uhlíku v lesních půdách (Gadgil a Gadgil, 1971; Koide a Wu, 2003). K sekvestraci uhlíku pravděpodobně dochází, protože aktivita EcM hub zvyšuje poměr C:N substrátu, což omezuje růst saprotrofních hub, které jsou limitovány dostupností dusíku. Dalším možným důvodem, proč k tomuto efektu dochází, je přístup EcM hub k uhlíkatým látkám od hostitelské rostliny, což znamená, že EcM houby jsou úspěšné v kompetici o substrát se saprotrofními houbami (Gadgil a Gadgil, 1971; Orwin et al., 2011). Půdy ekosystémů, které jsou dominované EcM a ErM rostlinami, obsahují o 70 % více uhlíku na jednotku dusíku než půda v ekosystémech, v nichž dominují AM rostliny. Toto zjištění spojuje funkční vlastnosti mykorhizních hub s ukládáním uhlíku v půdě, což znamená, že konkurence rostlin se saprotrofními houbami o živiny řídí cyklus uhlíku v terestrických ekosystémech (Averill et al., 2014). O důsledcích pro koloběh živin v různých ekosystémech se ví velmi málo a je potřeba dalšího výzkumu.



Obrázek č. 7: Model koloběhu živin (uhlík a dusík) v ektomykorhizním systému, kde převládá organický půdní materiál

Organický materiál vzniká odumřením částí rostlin a hub (mykorhizních i saprotrofních). Saprotrofní houby svou hydrolytickou aktivitou získávají živiny (uhlík a dusík) z organické hmoty, přičemž uvolňují uhlík ve formě CO_2 do atmosféry. Dusík je zadržen v mikrobiální biomase a dostává se do prostředí ve formě mikrobiální nekromasy. Ko-metabolická oxidace organické hmoty mykorhizními houbami vede ke získávání dusíku a zároveň k mineralizaci uhlíku. Mykorhizní houby dostávají fotosynteticky fixovaný uhlík od svých hostitelských rostlin výměnou za dusík. (Upraveno podle Lindahl a Tunlid, 2015)

1.3.2.1.3 Endofytické houby

Endofytické houby žijí alespoň část svého životního cyklu v rostlinných tkáních (stonky, listy a kořeny), aniž by svého hostitele významně negativně či pozitivně ovlivňovaly. Z toho plyne, že funkce endofytických hub v rostlinách jsou většinou neznámé. Bylo prokázáno, že některé endofytické houby mohou mít významnou roli v dekompozici rostlinné nekromasy (Kohout et al., 2018; Wolfe a Ballhorn, 2020). Oproti ostatním půdním mikroorganismům mají výhodu právě v tom, že obývají živé a stárnucí

rostlinná pletiva a tím mají výhodu v začátcích dekompozice po odumření rostlin (Hirose et al., 2013; Yuan a Chen, 2014). Ukázalo se, že některé studované druhy endofytických hub mají schopnost produkce hydrolytických enzymů, které se mohou podílet na dekompozičních procesech (Robl et al., 2013). Navíc, byla studována schopnost endofytických hub podílet se na dekompozici rostlinného ligninu (Osono a Takeda, 1999). Avšak role endofytických hub v dekompozici rostlinné a houbové nekromasy stále zůstává z větší části stále nepochopena. Rostliny v arktických oblastech jsou hojně kolonizovány endofytickými houbami (Jumpponen a Trappe, 1998), které mají tím pádem přístup ke snadno dostupnému uhlíku, což může ovlivnit dekompoziční procesy v půdě arktické tundry.

1.3.2.1.4 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické organismy, které se vyskytují v půdách všech ekosystémů. Půdní bakterie jsou rovněž známé pro svou schopnost degradovat rostlinný materiál, čímž se významně podílejí na dekompozičních procesech a cyklování živin v ekosystému (Lopez-Mondejar et al., 2016). Ve většině půd jsou hojně zastoupeny bakterie z kmene *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Lauber et al., 2009). Různé taxony bakterií významně liší ve svých enzymatických vlastnostech. Studie uvádějí, že nejméně 10 % bakterií, které se vyskytují v rostlinném opadu jsou schopné svými enzymatickými vlastnostmi rozkládat celulózu (Lopez-Mondejar et al., 2016). Geny pro extracelulární celulólytické enzymy se běžně vyskytují v bakteriálních genomech (Berlemont a Martiny, 2015). Bakterie z kmene *Proteobacteria* a *Bacteroidetes* se přednostně účastní rozkladu snadno degradovatelných komponent, tudíž jsou to typičtí dekompozitoři čerstvé nekromasy (Fierer et al., 2007). Půdní bakterie mohou rovněž přispívat k rozkladu fenolických látek, jako je rostlinný lignin (Brown a Chang, 2014). Bakterie byly identifikovány jako důležití rozkladači houbové nekromasy, především pak bakterie z rodu *Pedobacter*, *Chitinophaga*, *Pseudomonas*, *Viriovorax*, *Ewingella* a *Stenotrophomonas* (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018). Geny pro chitinolytické enzymy jsou hojně zastoupeny v bakteriálních genomech, zejména pak pro bakterie z kmene *Actinobacteria* (Talamantes et al., 2016). Vzhledem k již studovaným schopnostem půdních bakterií rozkládat rostlinný lignin lze předpokládat, že se bakterie mohou účastnit rozkladu rekalitrantních komponent houbové nekromasy.

1.3.2.2 Teplota

Dekompoziční procesy jsou na změny teploty citlivější než primární produkce a je známo, že teplota silně ovlivňuje proces dekompozice rostlinné nekromasy v půdě (Aerts, 1997; Davidson a Janssens, 2006). Obecně se předpokládá, že se zvyšující se teplotou se zvyšuje rychlost dekompozice rostlinného materiálu zvýšenou enzymovou aktivitou přítomné mikrobiální komunity dekompozitorů (Fierer et al., 2005; Hobbie, 2006) a lze předpokládat, že stejný trend bude platit pro rozklad houbové nekromasy.

K tomuto datu se jediná experimentální studie věnovala vlivu zvýšené teploty na dekompozici houbové nekromasy. Experiment proběhl v rašeliništním ekosystému a sledoval rozklad čtyř druhů hub, které se lišily v biochemickém složení (*Cenococcum geophilum*, *Meliniomyces bicolor*, *Oideodendron griseum* a *Suillus grisellus*). V tomto případě experimentálně zvýšená teplota pozitivně ovlivnila rychlost dekompozice houbové nekromasy (Fernandez et al., 2019).

1.3.2.3 CO₂

Zvyšování koncentrace CO₂ je jedním z průvodních jevů probíhající klimatické změny (Keeling et al., 1976). Bylo prokázáno, že následkem zvýšení koncentrace CO₂ je zvýšená primární produktivita rostlin (Curtis, 1996; Norby et al., 2005). Následná zvýšená alokace tohoto fotosynteticky fixovaného uhlíku je důležitá pro určení celkové uhlíkové bilance v ekosystémech v kontextu klimatické změny a určení zpětnovazebných mechanismů (Canadell et al., 1996). Pozornost zasluhuje zvýšená alokace uhlíku do rhizosféry, jelikož v rhizosféře se potkávají procesy rostlin a mikroorganismů (Coleman et al., 1992). Zvýšená alokace uhlíku do rhizosféry může měnit mikrobiální procesy poskytováním jednoduchých uhlíkatých látek například ve formě kořenových exudátů, což může stimulovat dekompozici rekalitrantních složek POM (priming effect) (Billes et al., 1993; Zak et al., 1993). Komplexní mechanismy vedoucí k priming effect zůstávají z velké části nepochopeny, ale obecně se předpokládá, že nízká kvalita POM omezuje dostupnost energie pro půdní mikroorganismy a následně je tedy snížena rychlost mineralizace. Priming effect je výsledkem zvýšené mikrobiální aktivity přítomné komunity mikroorganismů v důsledku vyšší dostupnosti energie a živin, které jsou uvolněny z čerstvého opadu nebo z kořenových exudátů rostlin (Kuzyakov et al., 2000). Priming effect je tedy klíčovým faktorem globálního cyklu uhlíku (Guenet et al., 2018; Kuzyakov, 2010; Perveen et al., 2019).

1.3.3 Dynamika dekompozice

Dekompozice houbové nekromasy vykazuje dvoufázovou kinetiku. To znamená, že nastává rychlá iniciační fáze, při níž dochází k rozkladu snadno degradovatelných látek. Iniciační fáze je následována pomalejším rozkladem perzistentní frakce, která může mít důležitou roli v sekvestraci uhlíku v půdě. Iniciační fáze dekompozice rostlinného opadu je běžně pomalejší než iniciační fáze dekompozice mycelia (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Schweigert et al., 2015).

Mycelia, která mají vyšší obsah chitinu nebo obecně dusíku, se rozkládají rychleji než ta s nižším obsahem dusíku (Snajdr et al., 2011).

Mycelium s vysokým obsahem melaninu podléhá dekompozici značně pomaleji než mycelium nemelanizované (viz 1.3.1.1.3), avšak i u nemelanizovaného mycelia přetrvává určitá rezistentní frakce (zhruba 25 % hmoty), která se zdá býti špatně rozložitelná a přispívá k tvorbě humusu v půdě (Brabcova et al., 2016).

2 Cíle práce

Cílem této práce je zhodnotit vliv úrovně melanizace houbové nekromasy a zvýšené teploty na dynamiku dekompozice houbové nekromasy a na složení komunity dekompozitorů (houby, bakterie).

H1: Houbová nekromasa s vyšší koncentrací špatně rozložitelného melaninu se bude rozkládat pomaleji než hyalinní houbová nekromasa v průběhu celé dekompozice.

H2: Koncentrace melaninu v houbové nekromasy se bude v průběhu dekompozice zvyšovat, jelikož bude klesat koncentrace snadno rozložitelných složek (polysacharidy, proteiny).

H3: Zvýšená teplota bude mít pozitivní vliv na rychlost rozkladu houbové nekromasy.

H4: Houbová nekromasa s vyšší koncentrací melaninu, která je inkubována v podmínkách zvýšené teploty (OTC) se bude rozkládat rychleji než v ambientních podmínkách, v důsledku zvýšené fotosyntetické aktivity vegetace v OTC, čímž dochází k větší alokaci snadno dostupných uhlíkatých látek do rhizosféry a stimulaci aktivity saprotrofních organismů (priming effect).

H5: Zvýšená teplota ovlivní složení mikrobiálních komunit na houbové nekromase.

H6: V počáteční fázi dekompozice bude nekromasa obou druhů hub kolonizována mikroorganismy, které využívají hlavně hydrolyzovatelné složky.

H7: Nekromasa s vyšší koncentrací melaninu bude více kolonizována mikroorganismy, které mohou pro rozklad použít nesespecifické oxidativní enzymy, především pak v pozdější fázi dekompozice.

3 Materiál a metody

Výše formulované hypotézy byly testovány v terénním experimentu probíhajícím v roce 2019. Byl sledován vliv melanizace houbové nekromasy a zvýšené teploty spojené s vyšší aktivitou rostlin na dynamiku dekompozice houbové nekromasy, změnu enzymové aktivity na rozkládajícím se houbovém myceliu, změnu obsahu melaninu a prvkového složení (poměr C:N) v průběhu degradace a také analýzu mikrobiálního společenstva na rozkládajícím se myceliu.

Celý experiment byl proveden na dvou různých druzích hub, které se významně liší v úrovni melanizace. Jako melanizovaný zástupce byla vybrána endofytická houba *Phialocephala fortinii*. Jako hyalinní zástupce byla vybrána EcM houba *Laccaria laccata*. Obě tyto houby se na lokalitě terénního experimentu přirozeně vyskytují a interagují s místními rostlinami (P. Kohout, osobní pozorování).

3.1 Příprava materiálu pro terénní experiment

3.1.1 Kultivace hub

Vybrané houby byly napěstovány na pevném MMN (modified Merlin-Norkans) médiu (Marx a Davey, 1969). Inkubace proběhla ve tmavé místnosti při pokojové teplotě (25 °C). Takto napěstované houby byly použity jako inokulační materiál pro napěstování velkého množství mycelia, což bylo provedeno v médiu tekutém. Příprava tekutého média spočívá ve smíchání jednoho litru dH₂O s 20 g malt extraktu. Do jedné Erlenmeyerovy baňky (250 ml) bylo nalito 50 ml připraveného média a baňka byla uzavřena molitanovou zátkou. Takto připravené baňky s médiem byly sterilizovány v autoklávu. Do sterilizovaného média ve sterilním prostředí laminárního boxu byly přeočkovány houby z média pevného. Baňky se zaočkovanými houbami byly umístěny do kultivační místnosti na třepačku, pokud se jedná o *P. fortinii*. Baňky s *L. laccata* byly umístěny do kultivační místnosti mimo třepačku. Po třech týdnech kultivace byla narostlá mycelia sklizena do sterilních centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. Materiál byl zmrazen, lyofilizován a skladován v mrazáku.

Lyofilizované mycelium bylo naváženo a po jednom gramu umístěno do vrůstových sáčků („mykobagů“) z nylonové membrány s okem o velikosti 50 µm tvaru rovnostranného trojúhelníku se stranou o délce 10 cm. Bylo rozhodnuto použít pro experiment mykobagy, přestože má tento přístup určité limitace. Nejznatelnější je fakt,

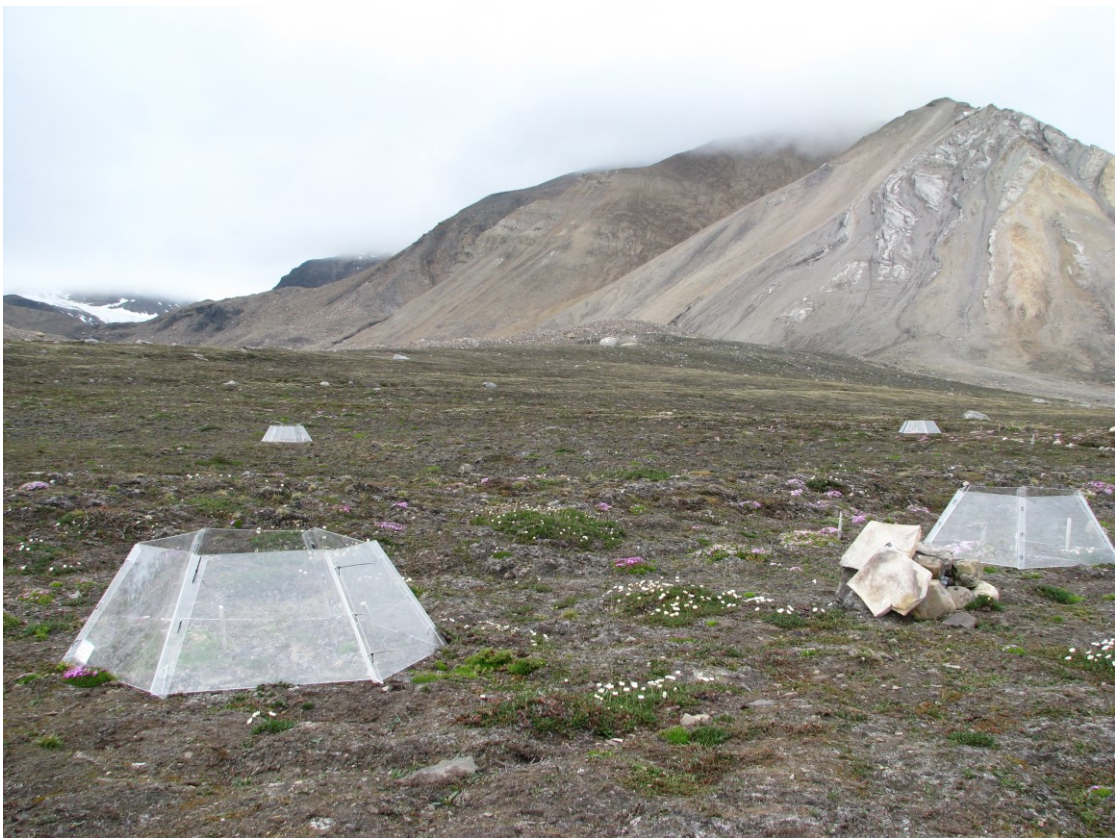
že v přirozeném prostředí je houbové mycelium heterogenně distribuováno. Nicméně se tento přístup v mnoha podobně navržených experimentech projevil velice prakticky (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez et al., 2019; Fernandez a Kennedy, 2018; Fernandez a Koide, 2012, 2014; Maillard et al., 2020; Ryan et al., 2020).

Připravené mykobagy s myceliem byly následně sterilizovány gamma zářením (sterilizace byla provedena na pracovišti muzea v Roztokách u Prahy). Takto připravený materiál byl za sterilních podmínek převezen na lokalitu terénního experimentu.

3.2 Popis lokality a průběhu založení experimentu v terénu

3.2.1 Popis lokality – souostroví Svalbard

Studie probíhala v polární oblasti na souostroví Svalbard, konkrétně na lokalitě ve fjordu Billefjorden (78.5304 °N, 16.3070 °E) v nadmořské výšce 70 m. n. m. (Obr. 8)



Obrázek č. 8: Lokalita terénního experimentu

Běžný roční průměr teplot se na souostroví Svalbard pohybuje kolem $-6,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, v červenci, kdy byl experiment zahájen, kolem $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na lokalitě převládá trpasličí vegetace dominovaná rostlinami *Bistorta vivipara*, *Carex rupestris*, *Cassiope tetragona*, *Cerastium arcticum*, *Draba sp.*, *Dryas octopetala*, *Equisetum variegatum*, *Equisetum scirpoides*, *Eutrema edwardsii*, *Juncus cf. biglumis*, *Luzula confusa*, *Minuartia stricta*, *Oxyria digyna*, *Sagina nivalis*, *Salix polaris*, *Saxifraga oppositifolia*, *Silene acaulis*, *Silene apetala* (Obr. 9). Přibližná pokrývnost vegetací na lokalitě se pohybuje mezi 30 – 50 %.



Obrázek č. 9: Ukázka vegetace na lokalitě terénního experimentu
 A) *Silene acaulis*, B) *Salix polaris*, C) *Cassiope tetragona*, D) *Bistorta vivipara*

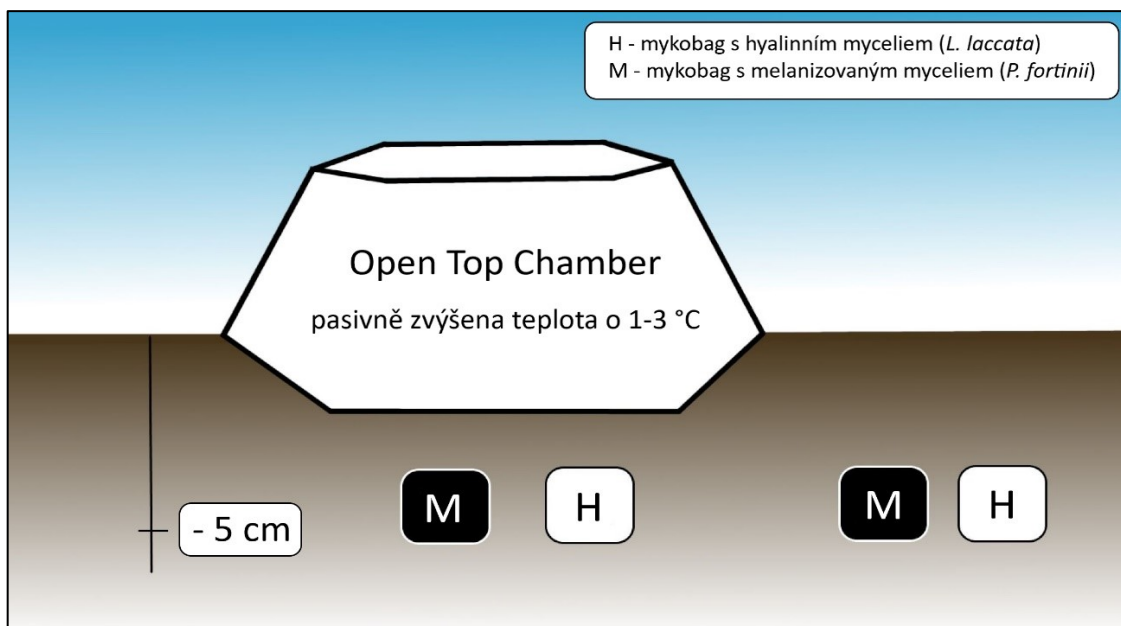
Na souostroví Svalbard dominuje arktická tundra. Tímto termínem se obecně označuje lokalita, která je umístěna za hranicí klimatických podmínek pro růst stromů. Dlouhé, chladné zimy a krátké vegetační období (cca 60 dnů) způsobuje, že v prostředí

tundry rostou pouze nízké rostliny a lišejníky. Půdy jsou tenké a chudé na minerály, navíc se zde vyskytuje permafrost, který je přirozenou bariérou průniku kořenového systému. Z důvodu těchto klimatických podmínek, jako je velmi nízká teplota a krátká vegetační sezóna, probíhají biologické procesy velmi pomalu v porovnání s ostatními ekosystémy. Dekompozice POM je pomalejší než rychlost primární produkce, což způsobuje, že jsou půdy tundry obrovským úložištěm uhlíku.

Arktické ekosystémy se během minulého století výrazně oteplily (Serreze et al., 2000) a hodnocení arktického klimatu (ACIA) předpokládá další zvýšení teploty o 4 – 7 °C do roku 2100 (ACIA, 2004). Poznání jak klimatická změna ovlivňuje procesy v arktických ekosystémech může být velmi důležité zejména pro predikci, jak budou reagovat další ekosystémy, kde se teplota zvyšuje pomaleji.

3.2.2 Provedení terénního experimentu

Na lokalitu bylo přepraveno celkem 128 mykobagů s lyofilizovaným sterilním myceliem, tedy 64 mykobagů s *P. fortinii* a 64 mykobagů s *L. laccata*. V terénním experimentu byl použit systém Open Top Chamber (OTC), kde je pasivně zvýšena teplota o 1-3 °C oproti okolí, přičemž konkrétní zvýšení teploty záleží na počasí (Obr. 10). 32 mykobagů s *P. fortinii* a 32 mykobagů s *L. laccata* bylo zakopáno do půdy v OTC a stejné množství bylo zakopáno do půdy mimo OTC, tedy do ambientních podmínek. Mykobagy byly umístěny do hloubky 5 cm, jelikož to odpovídá oblasti s největší kořenovou denzitou, tedy místu, kde se biomasa kořenových symbiontů přirozeně vyskytuje. Botanickým průzkumem byla zaznamenána vegetace do vzdálenosti 5 cm od umístění každého jednotlivého vzorku pro následné vyhodnocení vlivu vegetace. Byly zaznamenány souřadnice GPS všech jednotlivých OTC pro následné vyhodnocení vlivu prostoru na průběh experimentu.



Obrázek 10: Design terénního experimentu

Instalace byla provedena 10. července 2019. První odběr byl proveden 27. července 2019, tedy po 17 dnech. Druhý odběr byl proveden 7. září 2019, tedy necelé dva měsíce od instalace.

V prvním odběru bylo vyzvednuto 36 mykobagů, což znamená devět mykobagů na variantu. Ve druhém odběru bylo vyzvednuto 32 mykobagů, tedy osm mykobagů na variantu (Tab. 2).

Tabulka č. 2: Přehled provedených odběrů v sezóně 2019

DATUM ODBĚRU	POČET MYKOBAGŮ	MATERIÁL	PODMÍNKY
27. 7. 2019	9	<i>L. laccata</i>	OTC
	9	<i>L. laccata</i>	kontrola
	9	<i>P. fortinii</i>	OTC
	9	<i>P. fortinii</i>	kontrola
7. 9. 2019	8	<i>L. laccata</i>	OTC
	8	<i>L. laccata</i>	kontrola
	8	<i>P. fortinii</i>	OTC
	8	<i>P. fortinii</i>	kontrola

Další dva odběry byly původně naplánované na letní sezónu 2020, ale díky pandemii Covid-19 bylo nutné odběry posunout na letní sezónu 2021, což z časových

důvodů nelze zahrnout do této diplomové práce, ale poslouží k zasazení poznatků do širšího kontextu.

Odebrané mykobagy byly očištěny a zamrazeny. Materiál byl transportován do laboratoře, kde se uskutečnila lyofilizace materiálu. Lyofilizovaný materiál byl následně použit k analýzám.

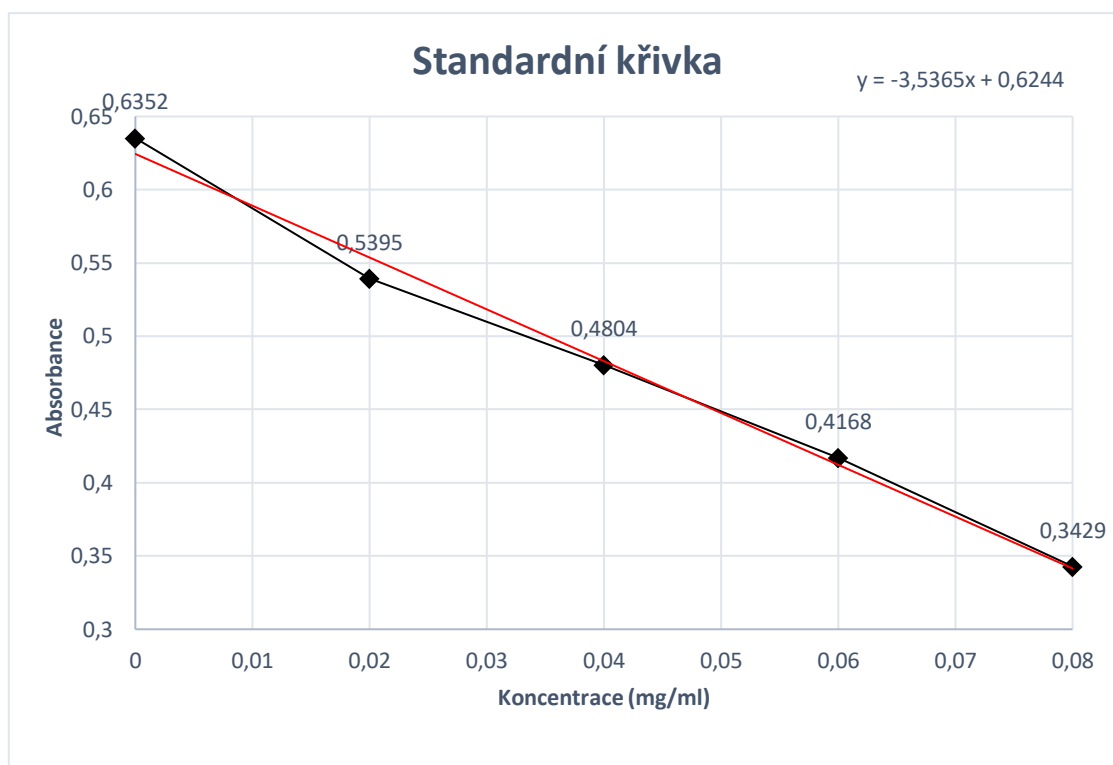
3.3 Stanovení úbytku substrátu

Lyofilizované mycelium bylo zváženo a jeho hmotnost byla porovnána s počáteční hmotností (1 g).

3.4 Stanovení obsahu melaninu

Jedná se o kvantitativní kolorimetrickou analýzu. Tato metoda spoléhá na silnou vazbu barvy Azure A na melanin, který se kvantifikuje měřením rozdílu v absorbanci vodného roztoku barviva před a po expozici melaninu (Fernandez a Koide, 2014).

Nejprve byla potřeba připravit roztok barvy Azure A (Thermo Fisher Scientific) rozpuštěním barvy v 0,1M HCl. Směs byla přefiltrována přes nitrocelulózovou membránu s póry o velikosti 0,45 μm . Roztok byl ředěn až na absorbanci 0,665 při vlnové délce 610 nm. Následně byla vypočtena standardní křivka absorbance pomocí melaninu, který byl izolován kyselou hydrolyzou z lyofilizovaného mycelia *P. fortinii*. Mycelium izolátu bylo umístěno do 6M HCl a bylo inkubováno při 80 °C po dobu čtyř dnů. Směs byla následně přefiltrována přes filtrační papír a pevná složka (melanin) byla několikrát omyta destilovanou vodou. Izolovaný melanin byl následně lyofilizován a skladován při -20 °C. Určité množství melaninu bylo umístěno do 3 ml roztoku barvy Azure A tak, aby výsledná koncentrace byla 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,06 mg/ml a 0,08 mg/ml. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 90 minut. Následně byla směs přefiltrována přes „syringe tip filter“ s póry o velikosti 0,45 μm (Sigma-Aldrich). Absorbance filtrátů byla měřena spektrofotometrem při vlnové délce 610 nm.



Graf č. 1: Standardní křivka pro měření koncentrace melaninu v materiálu

Černá čára s body představuje spojnicí datové řady. Červená čára představuje lineární spojnicí trendu ($y = -3,5365x + 0,6244$).

Bylo umístěno 6 mg každého lyofilizovaného vzorku do 12 ml roztoku barvy Azure A. Homogenizace byla provedena přístrojem Ultra-Turrax (Thermo Fisher Scientific). Inkubace proběhla při laboratorní teplotě po dobu 90 minut. Následně byla uskutečněna filtrace přes „syringe tip filter“ s póry o velikosti 0,45 μm (Sigma-Aldrich). Absorbance filtrátů byla měřena při vlnové délce 610 nm spektrofotometrem Infinite 200 PRO (Tecan) s využitím softwaru i-control. Změna v absorbanci byla použita pro výpočet obsahu melaninu ve vzorcích na základě standardní křivky.

3.5 C:N analýza

Analýza prvkového složení v materiálu byla provedena externí laboratoří (Analytická laboratoř Botanického ústavu v Průhonicích).

Jednotlivé vzorky z obou provedených odběrů byly homogenizovány a umlety na velikost částic $< 0,1$ mm. Takto připravené vzorky byly vysušeny při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$ a naváženy do speciálních cínových nádobek, které jsou vhodné pro použitý přístroj. Automatickým dávkovačem byly vzorky aplikovány do spalovací trubice analyzátoru

FLASH 2000 (Thermo Fisher Scientific). Zde byly vzorky spáleny v proudu čistého kyslíku při teplotě 1000 °C. Oxid chromitý byl přítomen jako katalyzátor. Vzniklé oxidy uhlíku a dusíku byly po průchodu spalovací trubici dále vedeny redukční trubicí (při teplotě 800 °C s mědí jako náplní) do sušící kolony, kde byla oddělena vlhkost. Dále byly plyny vedeny přes separační kolonu do vodivostního detektoru, kde byl stanoven obsah uhlíku a dusíku v materiálu. Pro vyhodnocení signálu byl použit software EagerSmart (Thermo Fisher Scientific). Jako nosný plyn sloužilo helium.

3.6 Stanovení enzymové aktivity

3.6.1 Stanovení aktivity hydrolytických enzymů

Pro stanovení enzymové aktivity v jednotlivých vzorcích pocházejících z obou provedených odběrů byla použita spektrofotometrická metoda s využitím fluorescenčně značených substrátů. Pozorování fluorescence bylo možné po enzymatickém štěpení substrátu, přičemž byly použity fluorescenční deriváty 4-methylumbellyferolu (MUF) a 7-amino-4-methylkumarinu (AMC). Tímto způsobem byla stanovena aktivita β -glukosidázy, α -glukosidázy, β -xylosidázy, N-acetylglukosaminidázy (chitinázy), celobiohydrolázy, β -galaktosidázy, lipázy a fosfomonoesterázy (fosfatázy).

Substráty byly připraveny předem do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml.

Substráty pro kalibraci:

- 1 mM MUF
- 0,1 mM MUF
- 0,01 mM MUF
- 1 mM AMC
- 0,1 mM AMC
- 0,01 mM AMC

Substráty pro měření enzymové aktivity:

- 2,5 mM MUFC (4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranosid; celobiohydroláza)
- 2,75 mM MUFG (4-methylumbellyferyl- β -D-glukopyranosid; β -glukosidáza)
- 1 mM MUFN (4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid; chitináza)
- 2,75 mM MUFP (4-methylumbellyferyl-fosfát; fosfatáza)
- 2,5 mM MUFX (4-methylumbellyferyl- β -D-xylopyranosid; β -xylosidáza)

- 2,5 mM MUFY (4-methylumbellyferyl-caprylát; lipáza)
- 2,5 mM MUFL (4-methylumbellyferyl- β -D-galaktopyranosi; β -galaktosidáza)
- 2,5 mM MUFaG (4-methylumbellyferyl α -D-glukopyranosid; α -glukosidáza)
- DMSO (dimethylsulfoxid)

Bylo naváženo 0,025 - 0,05 g lyofilizovaného materiálu (dle dostatku materiálu) do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. K 0,05 g materiálu bylo přidáno 20 ml acetátového pufru (5 mM, pH 5), který byl připraven navážením 2,78 g octanu sodného, k němuž byla přidáno 938 μ l kyseliny octové a 1 l destilované vody. K homogenizaci byl použit přístroj Ultra-Turrax (Thermo Fisher Scientific) a následně byly jednotlivé vzorky přefiltrovány skrze filtrační papír. Dále se pracovalo s výslednými filtráty.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 40 μ l temperovaných substrátů a kalibračních roztoků v uvedeném ředění. Do jamek se substráty MUFaG a MUFY bylo navíc přidáno 40 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO) pro zvýšení jejich rozpustnosti (Tab. 3). Do každé jamky bylo přidáno 200 μ l vzorku. Připravená mikrotitrační destička byla umístěna do inkubátoru nastaveného na teplotu 40 °C. Fluorescence byla načítána po 5 a 125 minutách na spektrofotometru Infinite 200 PRO (Tecan) s využitím softwaru i-control při vlnové délce excitace 355 nm a emise 460 nm.

Tab č. 3: Mikrotitrační destička s umístěním substrátů a kalibračních roztoků

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MUFG	MUFG	MUFG	MUFG	MUFG	MUFG	MUFG	MUFG	MUFG			
B	MUFP	MUFP	MUFP	MUFP	MUFP	MUFP	MUFP	MUFP	MUFP	10 μ l MUF \times 100	10 μ l MUF \times 100	10 μ l MUF1:100
C	MUFX	MUFX	MUFX	MUFX	MUFX	MUFX	MUFX	MUFX	MUFX	20 μ l MUF \times 100	20 μ l MUF \times 100	20 μ l MUF \times 100
D	MUFN	MUFN	MUFN	MUFN	MUFN	MUFN	MUFN	MUFN	MUFN	50 μ l MUF \times 100	50 μ l MUF \times 100	50 μ l MUF \times 100
E	MUFC	MUFC	MUFC	MUFC	MUFC	MUFC	MUFC	MUFC	MUFC	20 μ l MUF \times 10	20 μ l MUF \times 10	20 μ l MUF \times 10
F	MUFL	MUFL	MUFL	MUFL	MUFL	MUFL	MUFL	MUFL	MUFL	50 μ l MUF \times 10	50 μ l MUF \times 10	50 μ l MUF \times 10
G	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	MUFaG	10 μ l MUF	10 μ l MUF	10 μ l MUF
H	MUFY	MUFY	MUFY	MUFY	MUFY	MUFY	MUFY	MUFY	MUFY	20 μ l MUF	20 μ l MUF	20 μ l MUF

3.6.2 Stanovení aktivity oxidativních enzymů

Pro stanovení aktivity oxidativních enzymů v materiálu byly použity již připravené filtráty jednotlivých vzorků, které byla potřeba odsolit kolonkami PD-10 (GE Healthcare) dle pokynů výrobce.

Substráty pro stanovení aktivity lakázy:

- Citrát-fosfátový pufr (pH 5) byl připraven smícháním 2,24 g monohydrátu kyseliny citronové s 7,37 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ a 100 ml destilované vody.
- Roztok 2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzothiazolin-6-kyseliny sulfonové; ABTS) byl připraven smícháním 40 mg ABTS a 50 ml destilované vody.

Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μl odsolených vzorků, k nimž bylo přidáno 150 μl citrát-fosfátového pufru a 50 μl roztoku ABTS. Aktivita byla změřena za teploty 40 °C spektroskopicky při vlnové délce 420 nm jako změna absorbance. Měření probíhalo každé dvě minuty (7 x 2 min) na spektrofotometru Infinite 200 PRO (Tecan) s využitím softwaru i-control.

Substráty pro stanovení aktivity oxidázy, peroxidázy a Mn-peroxidázy:

- Fosfátový pufr (100 mM, pH 6,5) byl připraven smícháním 0,095 g KH_2PO_4 a 1,086 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ se 100 ml destilované vody.
- Roztok DMAB (25 mM) byl připraven smícháním 0,0826 g DMAB s 20 ml fosfátového pufru (pH 6,5).
- Roztok MBTH (1 mM) byl připraven smícháním 0,0043 g MBTH s 20 ml destilované vody.
- Roztok MnSO_4 (2 mM) byl připraven smícháním 0,016 g $\text{MnSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ s 50 ml destilované vody.
- Roztok EDTA (2 mM) byl připraven smícháním 0,074 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ s 50ml destilované vody.
- Sukcinát-laktátový pufr (100 mM, pH 4,5) byl připraven smícháním 0,146 g kyseliny jantarové a 1,64 g kyseliny mléčné se 100 ml destilované vody.

Nejprve byla potřeba si připravit čerstvý roztok H_2O_2 (50 μl 30% H_2O_2 s 85 ml destilované vody). Následně byly přichystány substráty, přičemž pro měření každého

enzymu náleží rozdílná kombinace pufrů (Tab. 4). Do příslušných jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 μ l vzorků (každý vzorek ve třech replikátech). Ke každému vzorku bylo přidáno 200 μ l příslušného substrátu. Aktivita byla změřena za teploty 40 °C spektroskopicky při vlnové délce 590 nm jako změna absorbance. Měření probíhalo každé dvě minuty (7 x 2 min) na spektrofotometru Infinite 200 PRO (Tecan) s využitím softwaru i-control.

Tabulka č. 4: Příprava substrátů pro měření aktivity oxidativních enzymů v materiálu

	Oxidáza	Peroxidáza	Mn-peroxidáza
Sukcinát-laktátový pufr	21 ml	21 ml	21 ml
DMAB	2,8 ml	2,8 ml	2,8 ml
MBTH	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
MnSO₄			1,4 ml
Roztok peroxidu		1,4 ml	1,4 ml
EDTA	1,4 ml	1,4 ml	
Destilovaná voda	1,4 ml		

3.7 Analýza mikrobiálního společenstva na rozkládajícím se myceliu

3.7.1 Izolace DNA

K extrakci DNA z rozkládajícího se mycelia byla použita modifikovaná metoda fenol-chloroformové extrakce (Sagova-Mareckova et al., 2008). Do sterilní zkumavky se skleněnými kuličkami bylo naváženo 0,05 g lyofilizovaného substrátu. Následně se přidalo 600 μ l extrakčního pufru a 300 μ l fenol-chloroformu-isoamylalkoholu (25:24:1). Proběhla homogenizace směsi použitím přístroje FastPrep (MP Biomedicals) třikrát na 20 vteřin s pětiminutovou pauzou mezi každými dvaceti vteřinami. Homogenizované vzorky byly centrifugovány po dobu 3 minut při 10000 rpm. Supernatant byl odebrán do sterilní mikrozukavky o objemu 1,5 ml. K supernatantu byl přidán fenol-chloroform-isoamylalkohol (1 objem supernatantu). Směs byla protřepána po dobu 2 minut a následně centrifugována po dobu 5 minut při 6000 rpm. Vzniklý supernatant byl odebrán do sterilní mikrozukavky o objemu 1,5 ml. K supernatantu byl přidán 1 objem chloroform-isoamylalkoholu (24:1). Směs byla protřepána po dobu 2 minut a následně centrifugována po dobu 5 minut při 6000 rpm. Supernatant byl odebrán do sterilní mikrozukavky o objemu 2 ml. K supernatantu byl přidán 10% CTAB v 0,7 M NaCl (1/10 objemu supernatantu) a 6M NaCl (1/3 objemu supernatantu). Směs byla promíchána a inkubována po dobu 30 minut při teplotě 65 °C. Po zchlazení

směsi na laboratorní teplotu byl přidán chloroform-isoamylalkoholu (1 objem směsi). Směs byla protřepána po dobu 2 minut a následně centrifugována po dobu 20 minut při 4500 rpm. Supernatant byl odebrán do sterilní mikrokumavky o objemu 1,5 ml, kde byl srážen přidáním isopropanolu (0,6 objemu supernatantu) a 3M NaAc (0,1 objemu supernatantu) po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Směs byla následně centrifugována po dobu 20 minut při 10000 rpm. Kapalína byla odebrána a pelet byl promyt 200 μ l studeného 70% EtOH. Směs byla centrifugována po dobu 20 minut při 10000 rpm, přičemž tekutina byla odstraněna. Pelet byl následně sušen v přístroji SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) po dobu 4 minut. Finálním krokem extrakce DNA bylo rozpuštění osušeného peletu v 50 μ l sterilní deionizované vody.

Extrahovaná DNA byla purifikována použitím GeneClean Turbo Kit (MP Biomedicals). Všechny kroky purifikace probíhaly dle pokynů výrobce. Výsledná koncentrace DNA byla změřena přístrojem NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Thermo Scientific).

3.7.2 PCR

Pro zmnožení úseků DNA byla použita metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) s použitím houbových a bakteriálních primerů.

3.7.2.1 PCR s houbovými primery

Amplifikace ITS2 úseku, která se nachází mezi 5.8S a LSU oblastí rDNA, byla provedena s označenými primery gITS7 / ITS4 (Ihrmark et al., 2012) za použití DNA, která byla extrahovaná ze vzorků rozkládajícího se mycelia, jako templátu. Z jednoho vzorku byly provedeny čtyři paralelní PCR reakce, z důvodu snížení vlivu chyb při PCR na složení společenstev. Každý vzorek obsahoval primer s jinou značkou (tag). Značka je molekulární identifikátor, který je unikátní pro každý vzorek. Negativní kontroly byly přítomny ve všech PCR reakcích.

Příprava reakční směsi s houbovými primery (na jeden vzorek):

5xQ5 Reaction Buffer	5 μ l
PCR Nucleotide Mix (10 mM)	0,5 μ l
BSA (10 mg/ml)	1,5 μ l
Primer gITS7 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer ITS4 (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0,25 μ l
5xQ5HighGC Enhancer	5 μ l
Templátová DNA	1 μ l
H ₂ O	9,75 μ l

Průběh amplifikace v thermocycleru (iBioTech):

- 94 °C, 5 minut
- 30 cyklů (94 °C, 30 vteřin; 56 °C, 30 vteřin; 72 °C, 30 vteřin)
- 72 °C, 7 minut
- 4 °C

Úspěšnost proběhlé PCR byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou MultiSUB Choice Trio (iBioTech). Příprava 1% gelu spočívá ve smíchání agarózy s pufrům TAE (tris-acetát-EDTA; 0,5 g agarózy/50 ml TAE). Směs agarózy a pufru TAE byla zahřívána dokud se agaróza úplně nerozpustila. Ke směsi byl přidán ethidium bromid (2 μ l EtBr/50 ml TAE). Směs byla následně nalita do vany s hřebenem pro vytvoření jamek. Tuhnutí gelu trvalo přibližně 30 minut a následně byl umístěn do aparatury na elektroforézu. Do první a poslední jamky byly nanесeny 3 μ l O'GeneRuler™100 bp Plus DNA Ladder (velikostní marker o definované velikosti jednotlivých fragmentů; Thermo Fisher Scientific). Ke 3 μ l vzorku byla přidána vizualizační barva 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) a jednotlivé obarvené vzorky byly přeneseny do zbývajících jamek gelu. Elektroforéza probíhala přibližně 35 minut při 100 V. Výsledky byly vizualizovány na transiluminátoru UltraCAM Digital Imaging System (American laboratory trading) a vyhodnoceny.

3.7.2.2 PCR s bakteriálními primery

Amplifikace V4 oblasti bakteriální 16S rDNA byla provedena s označenými primery 515F / 806R (Caporaso et al., 2011) za použití DNA, která byla extrahovaná ze vzorků rozkládajícího se mycelia, jako templátu. Z jednoho vzorku byly provedeny čtyři paralelní PCR reakce, z důvodu snížení vlivu chyb při PCR na složení společenstev. Každý vzorek obsahoval primer s jinou značkou. Značka je molekulární identifikátor, který je unikátní pro každý vzorek. Negativní kontroly byly přítomny ve všech PCR reakcích.

Příprava reakční směsi s bakteriálními primery (na jeden vzorek):

5xQ5 Reaction Buffer	5 μ l
PCR Nucleotide Mix (10 mM)	0,5 μ l
BSA (10 mg/ml)	1,5 μ l
Primer 515F (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Primer 806R (10 pmol/ μ l)	1 μ l
Q5 High-Fidelity DNA polymerase	0,25 μ l
5xQ5HighGC Enhancer	5 μ l
Templátová DNA	1 μ l
H ₂ O	9,75 μ l

Průběh amplifikace v thermocycleru (iBioTech):

- 94 °C, 4 minuty
- 25 cyklů (94 °C, 45 vteřin; 50 °C, 1 minuta; 72 °C, 75 vteřin)
- 72 °C, 10 minut
- 4 °C

Úspěšnost proběhlé PCR byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou (viz 3.7.2.1)

3.7.3 Příprava knihoven pro sekvenaci

Čtyři paralelní PCR produkty z jednoho vzorku byly sloučeny do jednoho vzorku o celkovém objemu 88 μ l, který byl přečištěn pomocí MinElute PCR Purification kit (Qiagen) a následně byla změřena koncentrace přítomné DNA pomocí Qubit fluorometru

(Qubit® 2.0 Fluorometer Life Technologies), pro což byl použit Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Následně byl připraven ekvimolární směsný vzorek s použitím TruSeq® DNA PCR-Free LT Kit (Illumina, USA). Ekvimolární směs byla sekvenována na platformě Illumina MiSeq (2×250 bázi).

3.8 Bioinformatické zpracování sekvenčních dat

Sekvenační data byla zpracována v programu SEED2 ver. 2.0.4 (Vetrovsky et al., 2018) pro vyhodnocení amplikonových sekvencí. V první řadě byla použita funkce „fastq-joining“ pro spojení párů sekvencí, přičemž méně kvalitní konce byly odstraněny. Za pomoci programu UCHIME, který je součástí Usearch 7.9.1090 (Edgar, 2010), byly nalezeny chimerické sekvence, které byly následně odstraněny. Výsledné sekvence byly uspořádány do operačních taxonomických jednotek (OTU) použitím funkce UPARSE, která je součástí Usearch 7.0.1090 (Edgar, 2013) na hladině podobnosti 97 %. Pro každou OTU byla vybrána nejčtenější sekvence a přes vyhledávání (algoritmus BLASTn) v databázi GenBank (14. 2. 2020) byla identifikována nejbližší houba/bakterie na úrovni rodu nebo druhu (Altschul et al., 1997).

Ekologická příslušnost hub byla odvozena použitím databáze FUNGuild (Nguyen et al., 2016). Výsledky byly zkontrolovány a upraveny ručně na základě předchozí zkušenosti.

3.9 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno v softwaru R.

Rozdíly v zůstatku hmotnosti substrátu během dekompozice, koncentrace melaninu, aktivity extracelulárních enzymů a prvkové složení materiálu (C:N) hub *L. laccata* a *P. fortinii* byly analyzovány pomocí ANOVA (analýza variance) následované post hoc testem Tukey honestly significant difference (HSD) s Boniferoniho korekcí. Normalita dat byla ověřena sestavením histogramu a Q-Q grafu. Rozdíly s $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Zastoupení (počty sekvencí) jednotlivých OTU mezi vzorky bylo standardizováno za použití Hellingerovy transformace a jako charakteristika podobnosti vzorků byla použita Bray-Curtis distance. Statistické vyhodnocení sekvenačních dat bylo provedeno testem PERMANOVA (permutační analýza variance) s 999 permutacemi pro vyhodnocení vlivu environmentálních faktorů (lokace, vegetace, čas odběru,

melanizace, ošetření) na složení houbových a bakteriálních komunit na rozkládajícím se myceliu. Dále bylo provedeno nemetrické vícerozměrné škálování (NMDS) s použitím Bray-Curtis distance.

Pro popis prostoru byly zhotoveny PCNM (Principal Coordinates of Neighbour Matrices) vektory založené na geografické vzdálenosti mezi vzorky (Borcard a Legendre, 2002).

Matice pro složení vegetace (botanický průzkum se záznamem přítomných rostlinných druhů) byla použita pro výpočet distanční matice založené na Jaccardově distanci. Matice byla následně použita pro výpočet PCA (Principal Component Analysis) os.

Byla provedena analýza relativního zastoupení oddělení, rodů, ekologických skupin (pro houby) a kmenů (pro bakterie) na základě abundance. Dominantní skupiny s celkovým zastoupením alespoň 0,1 % v některém ze vzorků byly graficky vizualizovány v programu Excel.

Pro určení významných druhů hub a bakterií byla použita statistická metoda Indicator species analysis. Druhy s $p < 0,01$ byly zaznamenány do výsledné tabulky.

4 Výsledky

4.1 Dynamika rozkladu houbové nekromasy

Rozklad houbové nekromasy proběhl v počáteční fázi inkubace velmi rychle. V průběhu celé inkubace se melanizovaná nekromasa rozkládala pomaleji než hyalinní nekromasa.

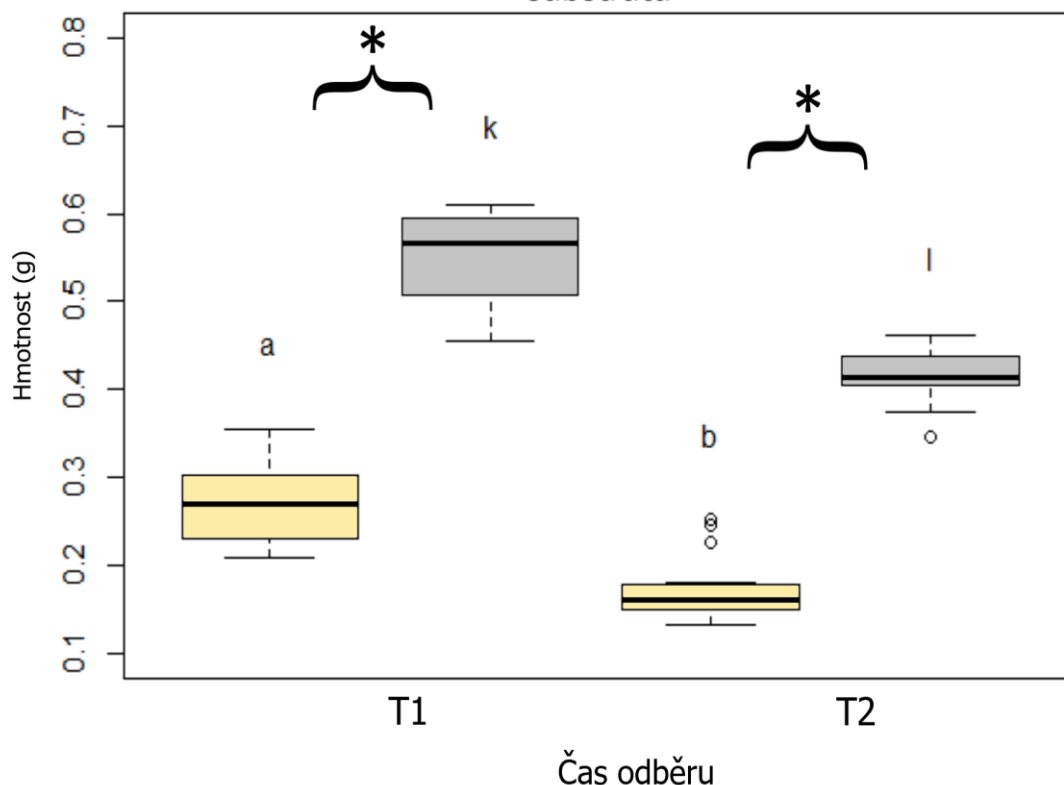
Na změnu zůstatku hmotnosti substrátu (Tab. 5, Graf 2) během dekompozice měl významný vliv čas odběru (T0 = počáteční stav, T1 = odběr po dvou týdnech inkubace, T2 = odběr po osmi týdnech inkubace) a úroveň melanizace (hyalinní, melanizovaná; trojcestná ANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,95$), kdežto ošetření (OTC = zvýšená teplota, kontrola) nemělo významný vliv ($p > 0,05$) v žádném čase odběru.

Tabulka č. 5: Hmotnost materiálu

Tabulka ukazuje průměrnou hodnotu zůstatku hmotnosti materiálu (g) \pm střední chyba průměru (SEM) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu) a dvou ošetření (OTC = podmínky zvýšené teploty v open top chamber, kontrola = kontrolní podmínky).

Houbová nekromasa	Čas odběru	Ošetření	Hmotnost (g)	%
<i>Laccaria laccata</i>	T0	-	1	100
	T1	OTC	0,29 \pm 0,01	29 \pm 1
		kontrola	0,25 \pm 0,02	25 \pm 2
	T2	OTC	0,17 \pm 0,01	17 \pm 1
		kontrola	0,18 \pm 0,01	18 \pm 1
	<i>Phialocephala fortinii</i>	T0	-	1
T1		OTC	0,55 \pm 0,02	55 \pm 2
		kontrola	0,56 \pm 0,01	56 \pm 1
T2		OTC	0,41 \pm 0,01	41 \pm 1
		kontrola	0,42 \pm 0,01	42 \pm 1

Vliv melanizace a času odběru na zůstatek hmotnosti substrátu

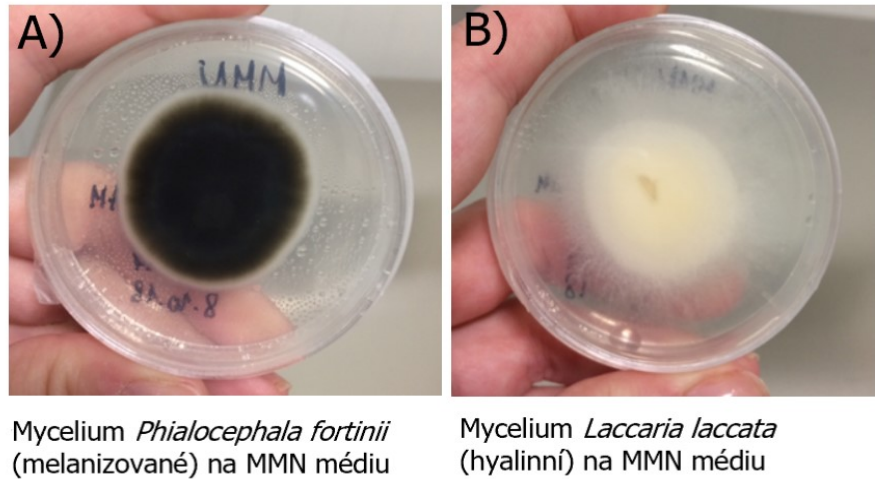


Graf č. 2: Vliv melanizace a faktoru času odběru na zůstatek hmotnosti substrátu během dekompozice houbové nekromasy

Krabicový graf zobrazující rozdíly v zůstatku hmotnosti mycelia u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/ *Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly zůstatku hmotnosti substrátu v průběhu dekompozice byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následované post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T1 n ~ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 n ~ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

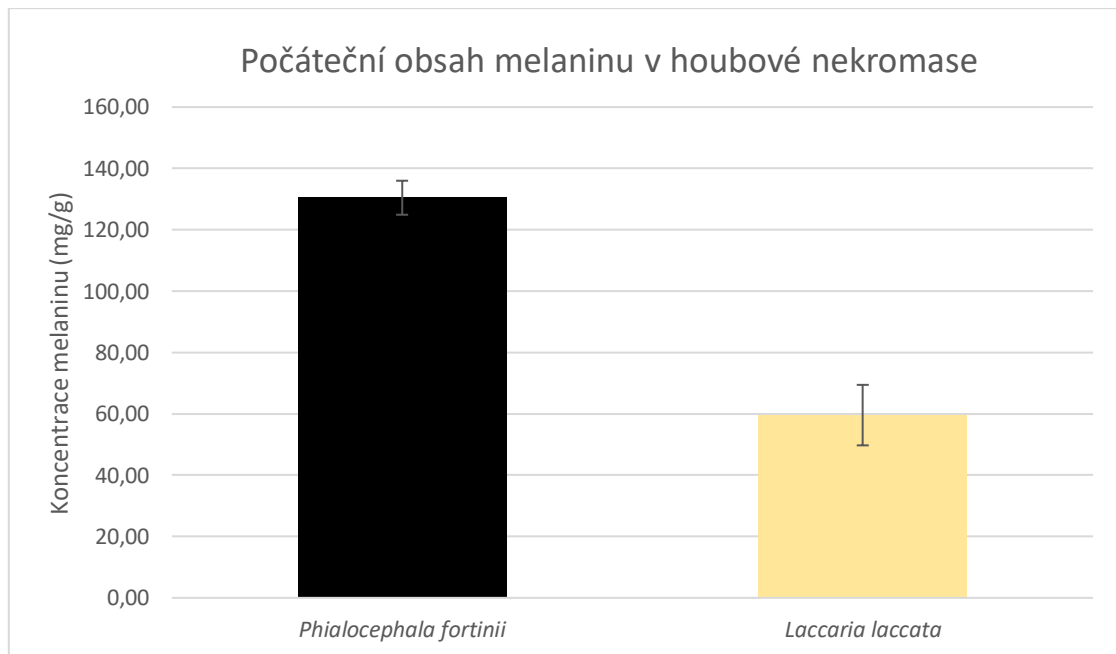
4.2 Obsah melaninu v průběhu dekompozice houbové nekromasy

Vizuálně patrné zbarvení materiálu koresponduje s počátečním obsahem melaninu v houbové nekromase (Obr. 11, Graf 3).



Obrázek č. 11: Mycelium vybraných hub na pevném MMN (modified Merlin-Norkans) médiu

Melanizované mycelium *Phialocephala fortinii* (A). Hyalinní mycelium *Laccaria laccata* (B).



Graf č. 3: Počáteční obsah melaninu v houbové nekromase

Průměrné hodnoty koncentrace melaninu v nekromase vybraných hub, jak bylo stanoveno kolorimetrickou metodou s použitím barvy Azure A ($n \sim$ tři na izolát). Svislé sloupce označují průměrnou koncentraci melaninu (mg/g sušiny) \pm standardní chyba průměru (SEM). Statistickým vyhodnocením (ANOVA) byl prokázán signifikantní rozdíl v koncentraci melaninu v houbové nekromase ($p < 0,01$; $R^2 = 0,91$).

Na změnu obsahu melaninu v houbovém materiálu (Tab. 5) v průběhu dekompozice měl významný vliv čas odběru (T0 = počáteční stav, T1 = odběr po dvou týdnech inkubace, T2 = odběr po osmi týdnech inkubace), úroveň melanizace materiálu (hyalinní, melanizovaná) a ošetření (OTC= zvýšená teplota, kontrola; trojcestná ANOVA; $p > 0,001$; $R^2 = 0,86$).

Vliv ošetření byl významný pouze u varianty hyalinní nekromasy v prvním čase odběru ($p < 0,01$; $R^2 = 0,49$). U ostatních variant byl vliv ošetření nevýznamný ($p > 0,05$).

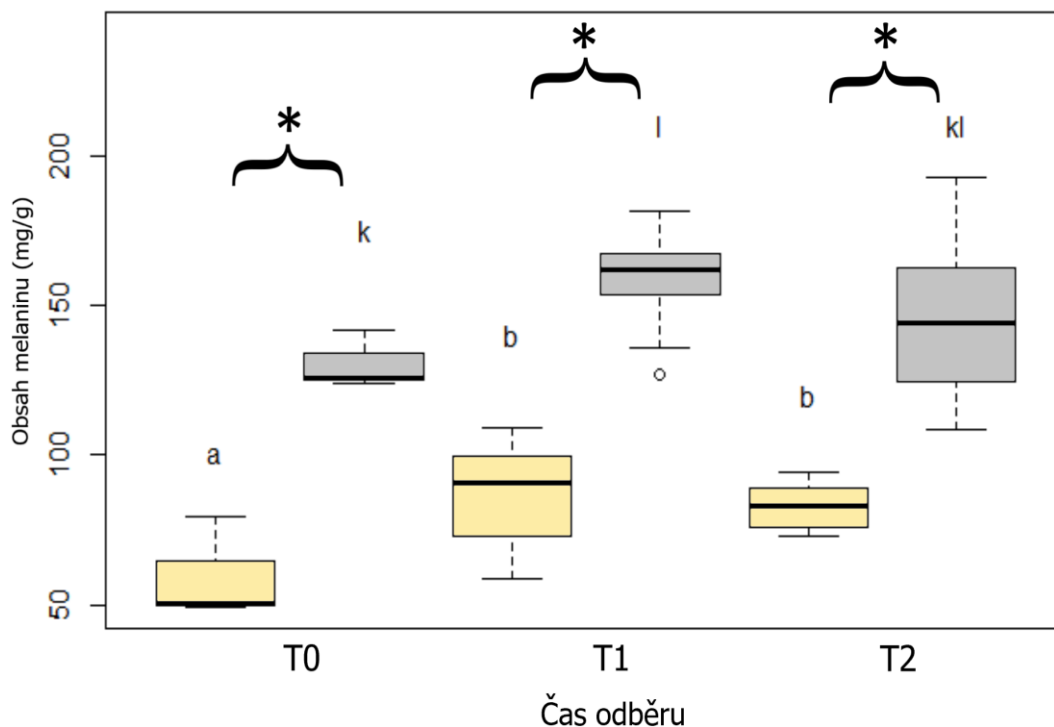
Čas odběru byl významný u hyalinní ($p < 0,05$; $R^2 = 0,24$) i melanizované nekromasy ($p < 0,05$; $R^2 = 0,20$). Úroveň melanizace houbového materiálu měla významný vliv na obsah melaninu v nekromase jak pro hodnoty vstupního materiálu (T0: $p < 0,01$; $R^2 = 0,91$), tak pro hodnoty všech provedených odběrů (T1: $p < 0,001$; $R^2 = 0,85$; T2: $p < 0,001$; $R^2 = 0,78$; Graf 4).

Tabulka č. 5: Obsah melaninu v materiálu

Tabulka ukazuje průměrnou hodnotu obsahu melaninu (mg/g suché hmotnosti) \pm střední chyba průměru (SEM) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu) a dvou ošetření (OTC = podmínky zvýšené teploty v open top chamber, kontrola = kontrolní podmínky).

Houbová nekromasa	Čas odběru	Ošetření	Obsah melaninu (mg/g)
<i>Laccaria laccata</i>	T0	-	59,58 \pm 9,86
	T1	OTC	96,8 \pm 3,44
		kontrola	74,81 \pm 4,38
	T2	OTC	85,78 \pm 2,68
		kontrola	80,86 \pm 2,13
	<i>Phialocephala fortinii</i>	T0	-
T1		OTC	163,73 \pm 4,35
		kontrola	154,36 \pm 5,44
T2		OTC	148,51 \pm 8,87
		kontrola	142,26 \pm 7,56

Změna obsahu melaninu v substrátu v průběhu dekompozice



Graf č. 4: Změna obsahu melaninu v substrátu v průběhu dekompozice

Krabicový graf zobrazující rozdíly v obsahu melaninu u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/ *Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly obsahu melaninu v substrátu v průběhu dekompozice byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následované post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty vstupního materiálu n ~ tři na variantu. Pro hodnoty v čase T1 n ~ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 n ~ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehle hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

4.3 Vliv poměru C:N na dekompozici houbové nekromasy

Krom obsahu melaninu se oba zkoumané druhy hub lišily i v procentuálním zastoupení uhlíku a dusíku v biomase. Poměr C:N byl výrazně vyšší pro melanizované mycelium (*Phialocephala fortinii*) než pro hyalinní mycelium (*Laccaria laccata*). Počáteční hodnota poměru C:N melanizovaného mycelia byla průměrně 16,06, kdežto počáteční hodnota poměru C:N hyalinního mycelia byla průměrně 9,12 (Tab. 7, Tab. 8). Rychleji tedy docházelo k dekompozici mycelia s nižším poměrem C:N.

Na změnu poměru C:N v houbovém materiálu v průběhu dekompozice měl významný vliv čas odběru (T0 = počáteční stav, T1 = odběr po dvou týdnech inkubace, T2 = odběr po osmi týdnech inkubace) a úroveň melanizace materiálu (hyalinní, melanizovaná), kdežto ošetření (OTC = zvýšená teplota, kontrola) významný vliv nemělo (trojcestná ANOVA; $p > 0,001$; $R^2 = 0,49$). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času odběru a úrovní melanizace materiálu ($p < 0,01$).

Poměr C:N se významně zvýšil v průběhu dekompozice u hyalinní ($p < 0,01$; $R^2 = 0,46$), nikoli však u melanizované nekromasy ($p > 0,05$; Graf 5).

Tabulka č. 7: Analýza počáteční chemie houbové nekromasy

V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty procentuálního zastoupení uhlíku, dusíku a melaninu v materiálu dále je uveden poměr C:N \pm střední chyba průměru (SEM) u dvou hub (*L. laccata*, *P. fortinii*).

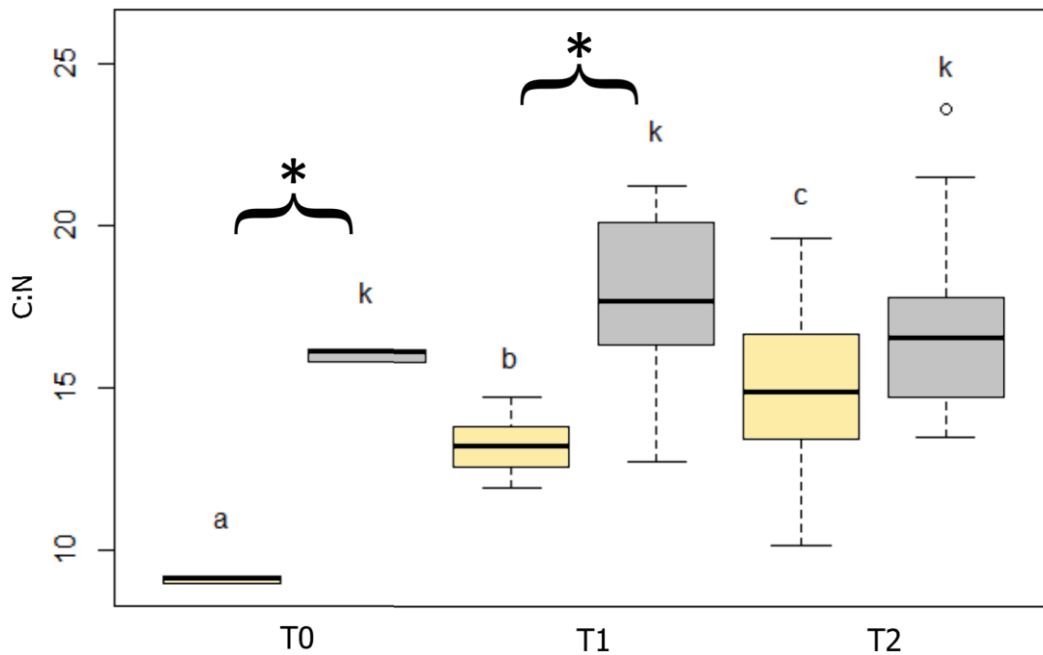
Analýza počáteční chemie nekromasy	<i>Laccaria laccata</i>	<i>Phialocephala fortinii</i>
Chemie		
C (%)	42,24 \pm 1,28	50,16 \pm 2,89
N (%)	4,63 \pm 0,17	3,13 \pm 0,20
C:N	9,12 \pm 0,06	16,06 \pm 0,13
Melanin (%)	5,96 \pm 0,99	13,04 \pm 0,55

Tabulka č. 8: Obsah uhlíku a dusíku v materiálu

V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty procentuálního zastoupení uhlíku a dusíku v materiálu, dále je uveden poměr C:N \pm střední chyba průměru (SEM) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu) a dvou ošetření (OTC = podmínky zvýšené teploty v open top chamber, kontrola = kontrolní podmínky).

Houbová nekromasa	Čas odběru	Ošetření	C (%)	N (%)	C:N
<i>Laccaria laccata</i>	T0	-	42,24 \pm 1,28	4,63 \pm 0,17	9,12 \pm 0,06
	T1	OTC	48,65 \pm 0,25	3,78 \pm 0,08	12,92 \pm 0,29
		kontrola	49,14 \pm 0,42	3,64 \pm 0,09	13,53 \pm 0,27
	T2	OTC	47,71 \pm 0,76	3,46 \pm 0,26	14,21 \pm 0,89
		kontrola	46,90 \pm 1,13	3,00 \pm 0,13	15,88 \pm 0,91
	<i>Phialocephala fortinii</i>	T0	-	50,16 \pm 2,89	3,13 \pm 0,20
T1		OTC	50,89 \pm 1,14	2,92 \pm 0,17	17,92 \pm 1,08
		kontrola	52,28 \pm 0,99	2,99 \pm 0,10	17,61 \pm 0,55
T2		OTC	48,57 \pm 1,45	3,02 \pm 0,18	16,48 \pm 1,01
		kontrola	48,95 \pm 0,84	2,94 \pm 0,17	17,04 \pm 1,08

Změna poměru C:N v substrátu v průběhu dekompozice



Graf č. 5: Změna poměru C:N v substrátu v průběhu dekompozice

Krabicový graf zobrazující rozdíly v poměru C:N u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/ *Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly obsahu melaninu v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následované post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b/c pro *L. laccata*, k pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty vstupního materiálu n ~ tři na variantu. Pro hodnoty v čase T1 n ~ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 n ~ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

4.4 Enzymová aktivita v průběhu dekompozice houbové nekromasy

4.4.1 Hydrolytické enzymy

Byla stanovena aktivita hydrolytických enzymů β -glukosidáza, fosfomonoesteráza (kyselá fosfatáza), β -xylosidáza, N-acetylglukosaminidáza (chitináza), celobiohydroláza, β -galaktosidáza, α -glukosidáza a lipáza (Tab. 6).

Statistickou analýzou (ANOVA, Tukey HSD) bylo testováno, zda má na změnu enzymové aktivity v substrátu v průběhu dekompozice vliv čas odběru (T0 = počáteční stav, T1 = odběr po dvou týdnech inkubace, T2 = odběr po osmi týdnech inkubace), úroveň melanizace materiálu (hyalinní, melanizovaná) a ošetření (OTC = zvýšená teplota, kontrola).

Enzymová aktivita, která byla detekována ve vstupním materiálu, pravděpodobně reprezentuje původní enzymovou aktivitu *Laccaria laccata* a *Phialocephala fortinii*, nikoli enzymovou aktivitu vyvolanou rozkladem materiálu.

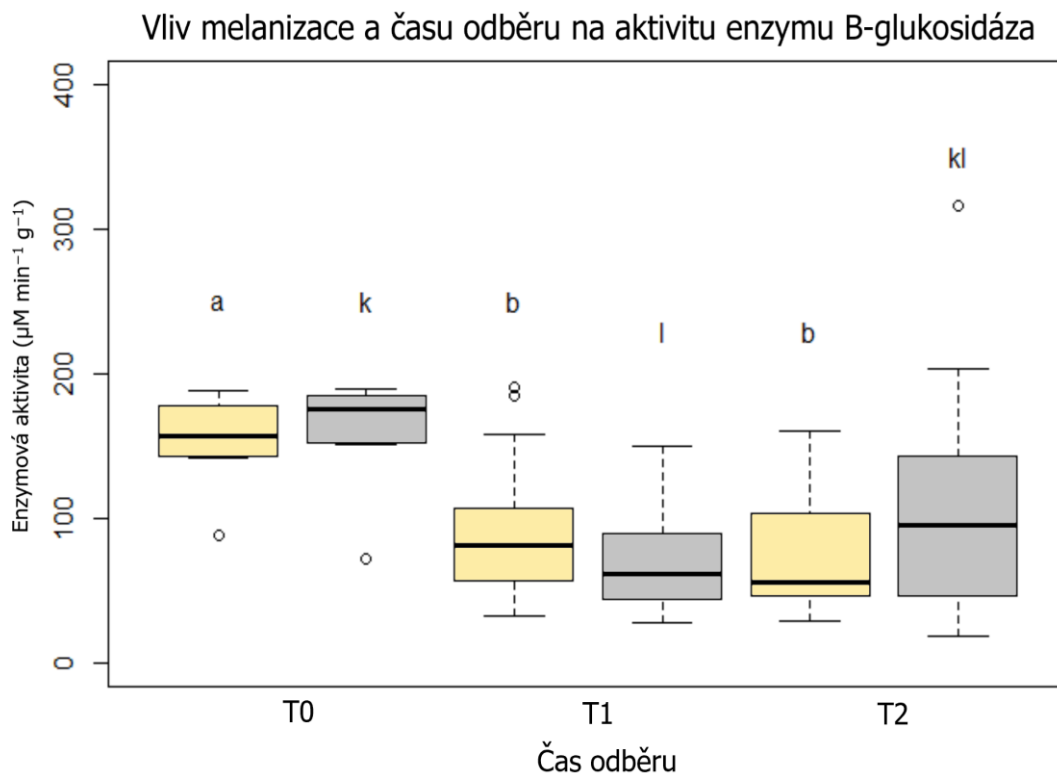
Ošetření se ukázalo u obou typů mycelia u všech testovaných enzymů jako nevýznamné ($p > 0,05$). Z tohoto důvodu nebylo zahrnuto do grafické vizualizace výsledků.

Tabulka č. 6: Aktivita enzymů na rozkládajícím se myceliu

Tabulka ukazuje průměrné hodnoty enzymové aktivity měřených enzymů ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) \pm střední chyba průměru (SEM) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu) a dvou ošetření (OTC = podmínky zvýšené teploty v open top chamber, kontrola = kontrolní podmínky). Pro hodnoty v T0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 $n \sim$ osm na variantu.

Houbová nekromasa	Čas odběru	Ošetření	β -glukosidáza	Fosfomonoesteráza	β -xylosidáza	N-acetylglukosaminidáza
<i>Laccaria laccata</i>	T0	-	153,95 \pm 11,03	411,23 \pm 22,75	0,98 \pm 0,30	20,96 \pm 1,66
	T1	OTC	105,55 \pm 19,97	227,44 \pm 69,60	1,57 \pm 0,27	17,03 \pm 2,92
		kontrola	70,60 \pm 8,19	96,14 \pm 23,21	1,00 \pm 0,18	8,76 \pm 1,76
	T2	OTC	58,49 \pm 9,88	67,05 \pm 13,16	1,09 \pm 0,16	11,99 \pm 2,61
		kontrola	87,47 \pm 18,12	131,83 \pm 52,70	2,06 \pm 0,34	13,13 \pm 1,07
	<i>Phialocephala fortinii</i>	T0	-	160,70 \pm 13,73	206,43 \pm 18,33	70,24 \pm 3,22
T1		OTC	78,62 \pm 13,93	266,55 \pm 45,93	11,20 \pm 2,35	12,41 \pm 1,86
		kontrola	71,64 \pm 14,59	209,06 \pm 33,21	11,12 \pm 2,17	9,83 \pm 1,52
T2		OTC	137,29 \pm 35,87	205,99 \pm 28,85	5,79 \pm 1,86	17,10 \pm 2,61
		kontrola	88,02 \pm 11,78	195,83 \pm 50,64	6,14 \pm 1,81	19,93 \pm 5,20
<i>Laccaria laccata</i>		T0	-	17,57 \pm 2,09	19,71 \pm 1,67	1,68 \pm 0,43
	T1	OTC	11,31 \pm 3,85	9,80 \pm 2,09	3,99 \pm 0,60	612,49 \pm 87,58
		kontrola	4,67 \pm 0,10	6,12 \pm 1,02	2,60 \pm 0,40	476,17 \pm 45,52
	T2	OTC	5,44 \pm 1,34	8,49 \pm 2,11	3,27 \pm 0,45	453,18 \pm 67,01
		kontrola	14,87 \pm 4,83	3,32 \pm 0,89	3,25 \pm 0,30	491,37 \pm 36,28
	<i>Phialocephala fortinii</i>	T0	-	59,23 \pm 2,86	43,45 \pm 2,49	176,93 \pm 9,48
T1		OTC	9,25 \pm 2,35	10,07 \pm 1,68	64,73 \pm 10,63	447,65 \pm 41,78
T2		kontrola	7,82 \pm 2,76	9,57 \pm 2,34	40,63 \pm 7,44	439,11 \pm 34,88
	OTC	34,85 \pm 14,76	5,87 \pm 1,17	15,13 \pm 2,79	581,10 \pm 33,42	
kontrola	10,50 \pm 2,36	10,75 \pm 4,78	17,74 \pm 4,07	633,32 \pm 34,10		

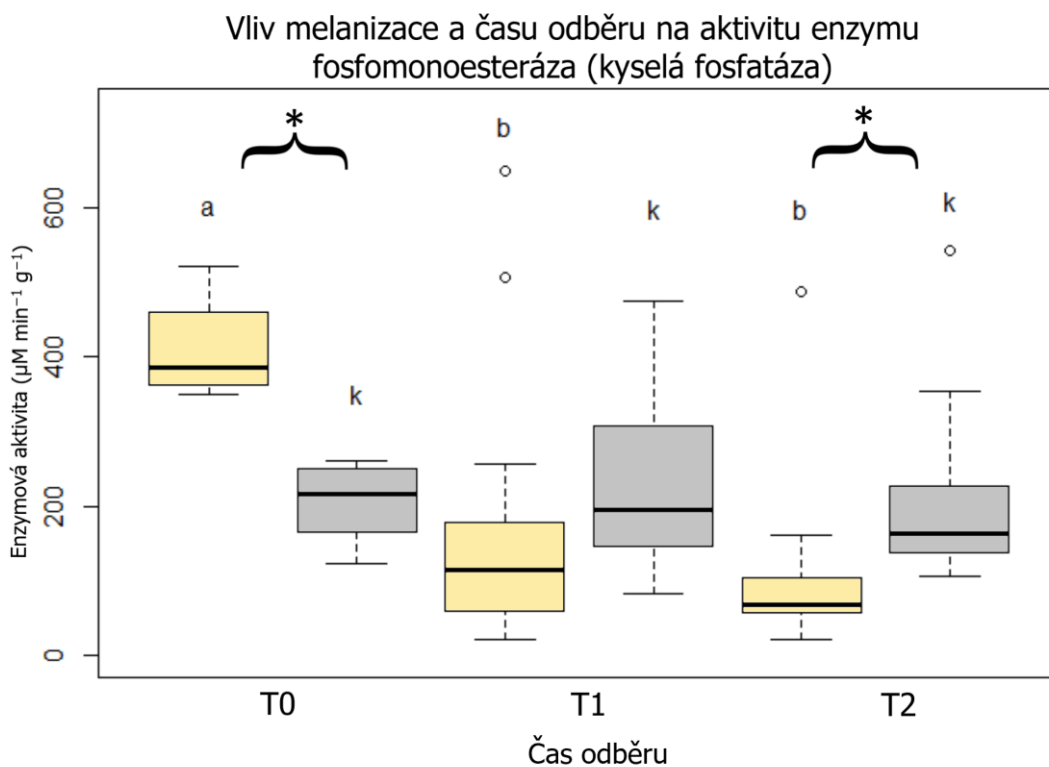
Aktivita enzymu β -glukosidáza byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž po dvou týdnech inkubace výrazně poklesla. Po osmi týdnech inkubace nedošlo u hyalinní nekromasy k žádné výrazné změně, kdežto aktivita enzymu na melanizované nekromase měla tendenci růst. Čas odběru se ukázal jako významný u hyalinní ($p < 0,001$; $R^2 = 0,33$) i melanizované nekromasy ($p < 0,01$; $R^2 = 0,24$), kdežto úroveň melanizace nebyla významná v žádném čase odběru ($p > 0,05$; Graf 6).



Graf č. 6: Aktivita enzymu β -glukosidáza v průběhu dekompozice

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T0 n ~ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 n ~ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 n ~ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptýl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

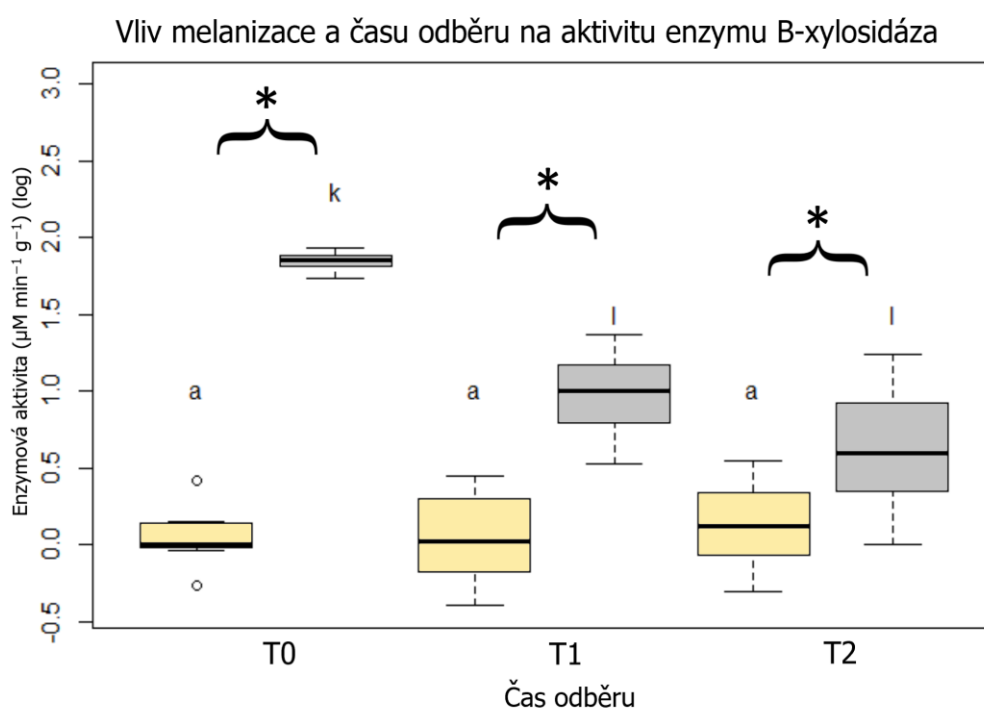
Aktivita enzymu fosfomonoesteráza (kyselá fosfatáza) byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž hyalinní nekromasa vykazovala výrazně vyšší aktivitu než melanizovaná. Po dvou týdnech inkubace došlo u hyalinní nekromasy k poklesu v aktivitě. Po osmi týdnech inkubace nedošlo k další změně. U melanizované nekromasy nedošlo k žádné výrazné změně v průběhu celé inkubace. Čas odběru byl významný pouze pro změnu v aktivitě enzymu u hyalinní nekromasy ($p < 0,001$; $R^2 = 0,55$), nikoli melanizované ($p > 0,05$). Úroveň melanizace materiálu byla významná pro hodnoty vstupního materiálu (T0: $p < 0,001$; $R^2 = 0,78$) a po osmi týdnech inkubace (T2: $p < 0,05$; $R^2 = 0,18$) (Graf 7). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a úrovně melanizace ($p < 0,001$).



Graf č. 7: Aktivita enzymu fosfomonoesteráza (kyselá fosfatáza)

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptýl a odlehle hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

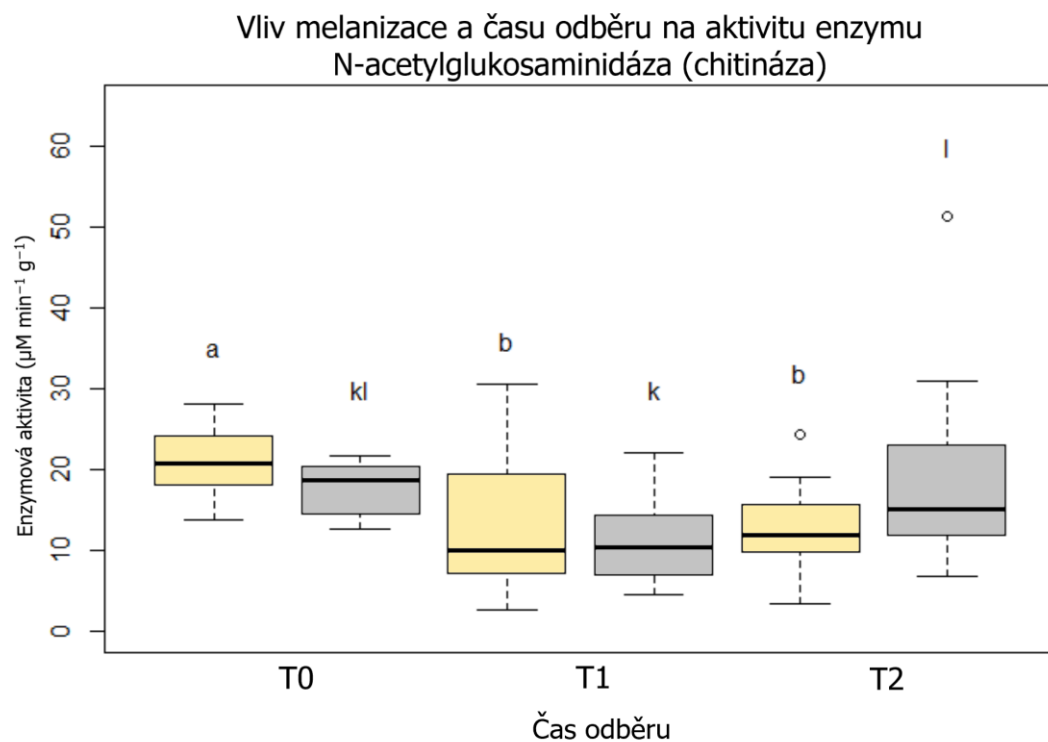
Aktivita enzymu β -xylosidáza byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž melanizovaná nekromasa vykazovala výrazně vyšší aktivitu než hyalinní. U hyalinní nekromasy nedošlo v průběhu inkubace k žádné změně. U melanizované nekromasy došlo v průběhu inkubace k postupnému snížení aktivity od vstupní hodnoty. Čas odběru byl významný pouze pro změnu v aktivitě enzymu u melanizované nekromasy ($p < 0,001$; $R^2 = 0,94$), nikoli hyalinní ($p > 0,05$). Úroveň melanizace byla významná jak u vstupního materiálu (T0: $p < 0,001$; $R^2 = 0,97$), tak i u všech dalších odběrů (T1: $p < 0,001$; $R^2 = 0,54$; T2: $p < 0,01$; $R^2 = 0,28$; Graf 8). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a melanizace ($p < 0,001$).



Graf č. 8: Aktivita enzymu β -xylosidáza

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

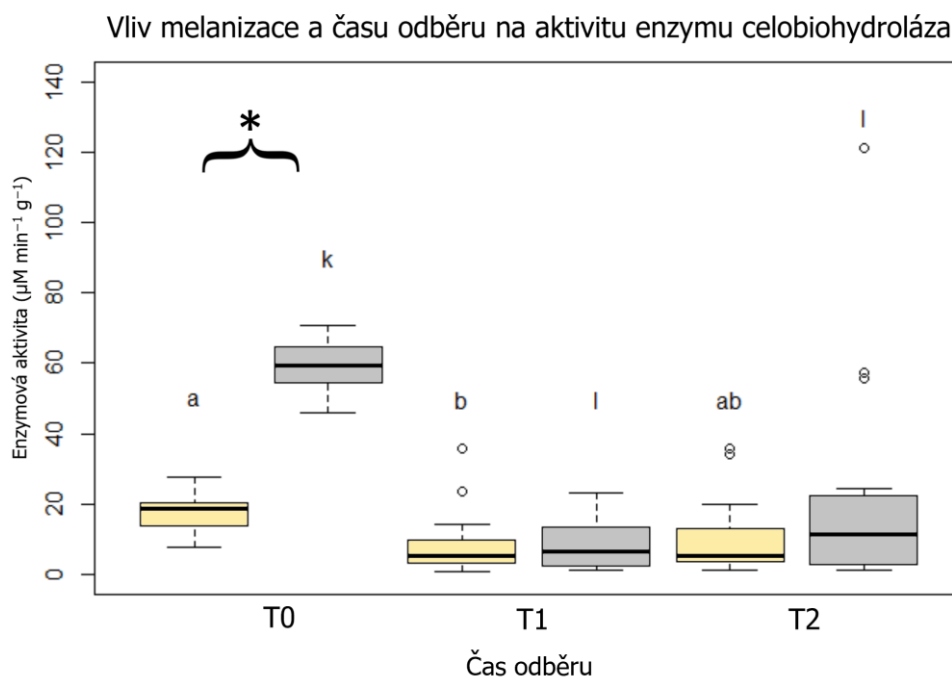
Aktivita enzymu N-acetylglukosaminidáza (chitináza) byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž se tyto dvě hodnoty od sebe nelišily. U hyalinní nekromasy došlo ke snížení enzymové aktivity po dvou týdnech inkubace. Po osmi týdnech inkubace nedošlo k další změně. U melanizované nekromasy došlo po dvou týdnech inkubace k nevýznamnému snížení enzymové aktivity oproti vstupním hodnotám. Po osmi týdnech inkubace došlo ke zvýšení enzymové aktivity oproti odběru po dvou týdnech inkubace, nikoli oproti vstupním hodnotám materiálu. Čas odběru se ukázal jako významný u hyalinní ($p < 0,05$; $R^2 = 0,20$) i melanizované nekromasy ($p < 0,05$; $R^2 = 0,18$), kdežto úroveň melanizace nebyla významná v žádném čase odběru ($p > 0,05$; Graf 9). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a melanizace ($p < 0,05$).



Graf č. 9: Aktivita enzymu N-acetylglukosaminidáza (chitináza)

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

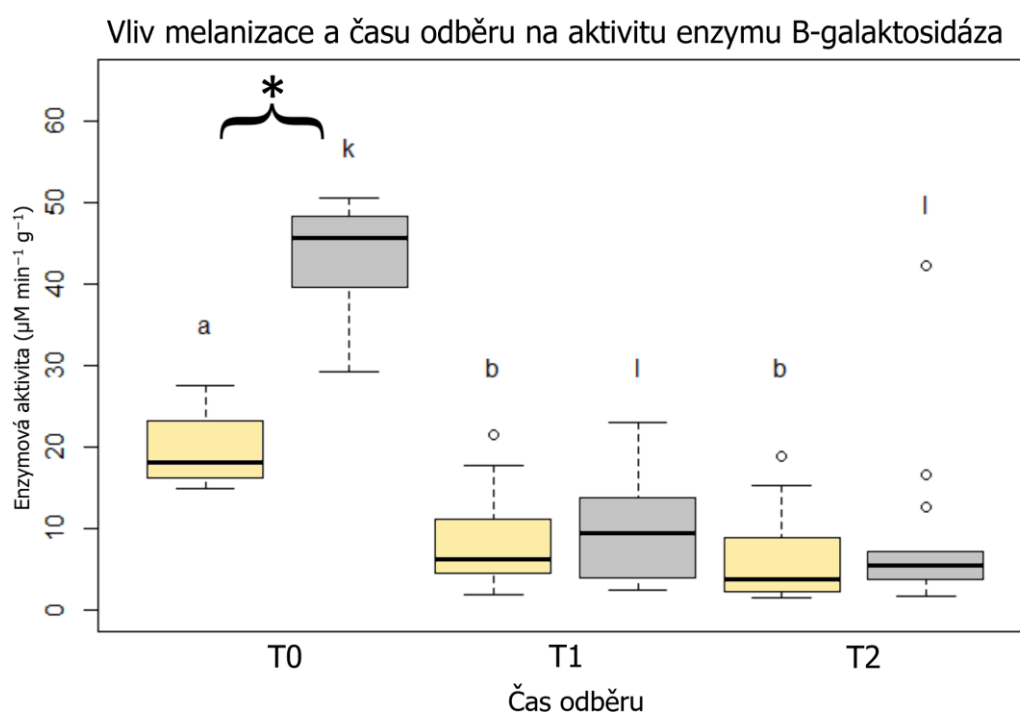
Aktivita enzymu celobiohydroláza byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž hodnoty aktivity melanizované nekromasy významně převyšovaly hodnoty aktivity hyalinní nekromasy. Po dvou týdnech inkubace došlo k významnému snížení enzymové aktivity u obou typů nekromasy, přičemž hodnoty se od sebe nelišily. Po osmi týdnech inkubace došlo k mírnému zvýšení aktivity u hyalinní nekromasy, přičemž se hodnoty lišily od hodnot z odběru po dvou týdnech inkubace, nikoli však od hodnot vstupního materiálu. U melanizované nekromasy nedošlo k významné změně po osmi týdnech inkubace. Čas odběru se ukázal jako nevýznamný u hyalinní ($p > 0,05$), ale významný u melanizované nekromasy ($p < 0,001$; $R^2 = 0,47$). Úroveň melanizace se ukázala jako významná pouze u rozdílu hodnot vstupního materiálu (T_0 : $p < 0,001$; $R^2 = 0,91$; Graf 10). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a melanizace ($p < 0,001$).



Graf č. 10: Aktivita enzymu celobiohydroláza

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T_0 = hodnoty vstupního materiálu, T_1 = dva týdny od založení experimentu, T_2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T_0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T_1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T_2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehle hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

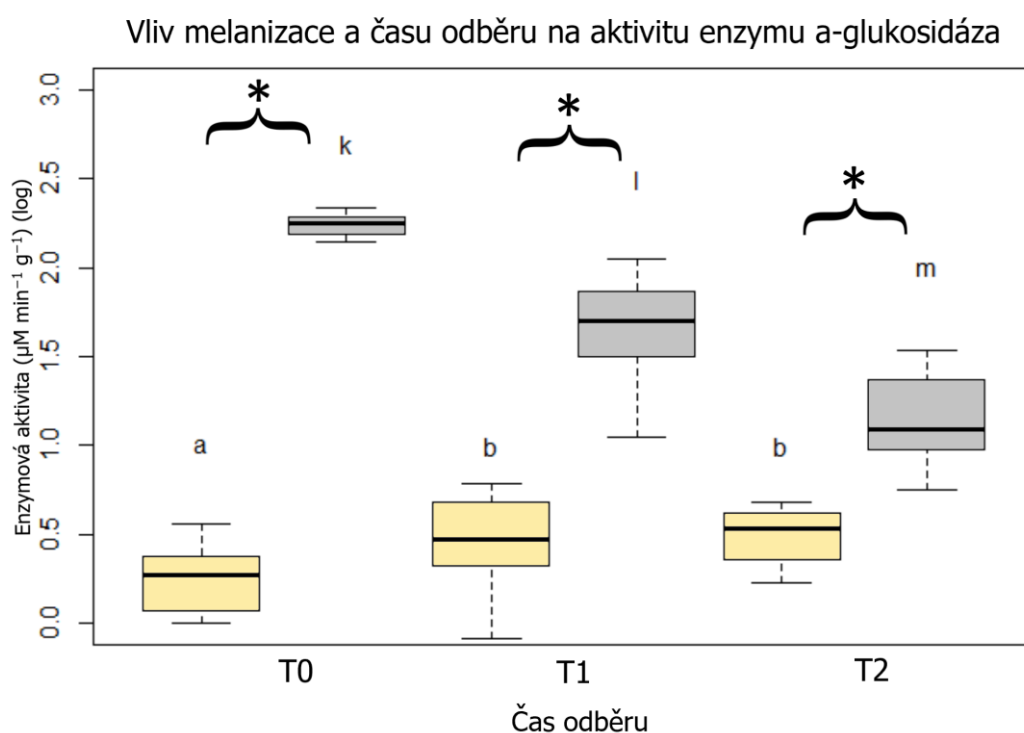
Aktivita enzymu β -galaktosidáza byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž hodnoty aktivity melanizované nekromasy významně převyšovaly hodnoty aktivity hyalinní nekromasy. Po dvou týdnech inkubace došlo k významnému snížení enzymové aktivity u obou typů nekromasy, přičemž hodnoty se od sebe nelišily. Po osmi týdnech inkubace nedošlo k žádným významným změnám. Čas odběru se ukázal jako významný u hyalinní ($p < 0,001$; $R^2 = 0,52$) i melanizované nekromasy ($p < 0,001$; $R^2 = 0,76$). Úroveň melanizace se ukázala jako významná pouze u rozdílu hodnot vstupního materiálu (T_0 : $p < 0,001$; $R^2 = 0,82$; Graf 11). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a melanizace ($p < 0,001$).



Graf č. 11: Aktivita enzymu β -galaktosidáza

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T_0 = hodnoty vstupního materiálu, T_1 = dva týdny od založení experimentu, T_2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T_0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T_1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T_2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

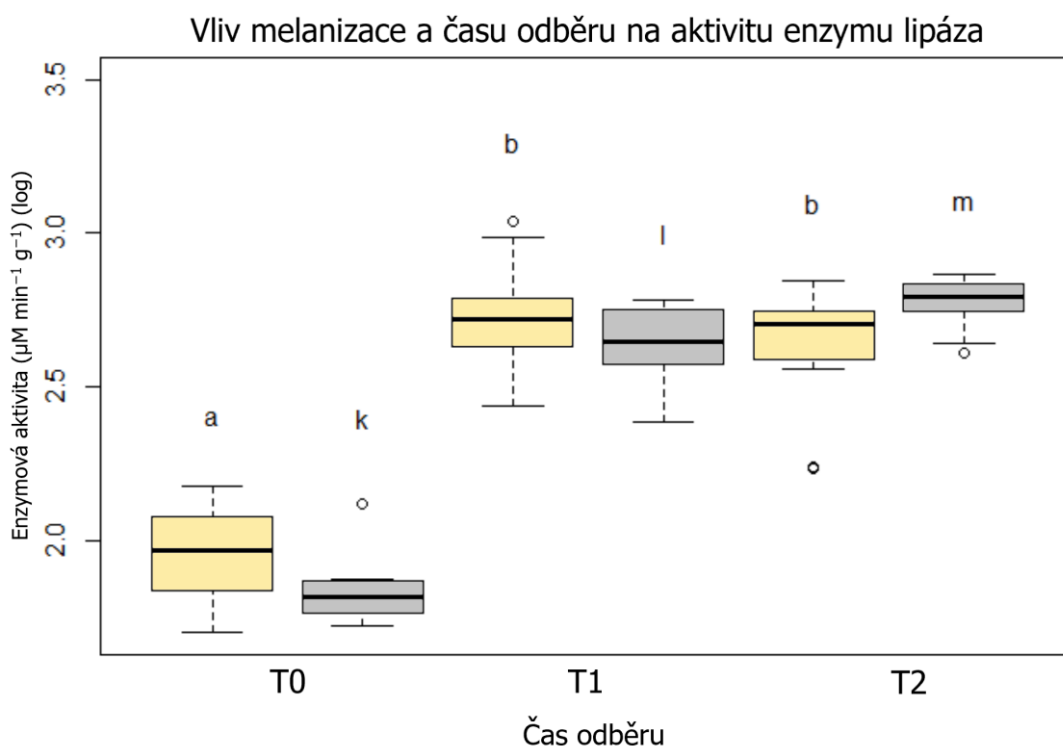
Aktivita enzymu α -glukosidáza byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž hodnoty aktivity melanizované nekromasy významně převyšovaly hodnoty aktivity hyalinní nekromasy. U hyalinní nekromasy došlo po dvou týdnech inkubace k významnému navýšení aktivity enzymu. Po osmi týdnech inkubace nedošlo k další změně. U melanizované nekromasy došlo ke snížení enzymové aktivity po dvou týdnech inkubace, navíc došlo k dalšímu snížení aktivity po osmi týdnech inkubace. Čas odběru se ukázal jako významný u hyalinní ($p < 0,05$; $R^2 = 0,19$) i melanizované nekromasy ($p < 0,001$; $R^2 = 0,87$). Úroveň melanizace se ukázala jako významná jak u vstupního materiálu (T0: $p < 0,001$; $R^2 = 0,96$), tak i u všech dalších odběrů (T1: $p < 0,001$; $R^2 = 0,60$; T2: $p < 0,001$; $R^2 = 0,50$; Graf 12). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a melanizace ($p < 0,001$).



Graf č. 12: Aktivita enzymu α -glukosidáza

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l/m pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptýl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

Aktivita enzymu lipáza byla detekována ve vstupním materiálu u obou typů nekromasy, přičemž hodnoty se od sebe nelišily. U obou typů nekromasy došlo k výraznému navýšení enzymové aktivity po dvou týdnech inkubace. Po osmi týdnech inkubace nedošlo k dalším výrazným změnám u hyalinní nekromasy, kdežto u melanizované nekromasy došlo k dalšímu navýšení enzymové aktivity. Čas odběru se ukázal jako významný u hyalinní ($p < 0,001$; $R^2 = 0,51$) i melanizované nekromasy ($p < 0,001$; $R^2 = 0,81$). Úroveň melanizace se ukázala jako nevýznamná ($p > 0,05$; Graf 13). Byla zjištěna významná interakce mezi faktorem času a melanizace ($p < 0,01$).



Graf č. 13: Aktivita enzymu lipáza

Krabicový graf zobrazující rozdíly v enzymové aktivitě ($\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché hmotnosti) u dvou vybraných hub (*Laccaria laccata* – žlutá barva/*Phialocephala fortinii* – šedá barva) ve třech časech (T0 = hodnoty vstupního materiálu, T1 = dva týdny od založení experimentu, T2 = osm týdnů od založení experimentu). Rozdíly v enzymové aktivitě v nekromase byly analyzovány pomocí statistického testu ANOVA následovaná post hoc testem Tukey HSD. Významné rozdíly týkající se faktoru času jsou vyjádřeny písmenným označením (a/b pro *L. laccata*, k/l/m pro *P. fortinii*) a významné rozdíly mezi dvěma zkoumanými druhy hub hvězdičkou. Pro hodnoty v čase T0 $n \sim$ osm na variantu. Pro hodnoty v čase T1 $n \sim$ devět na variantu. Pro hodnoty v T2 $n \sim$ osm na variantu. Horní ohraničení krabicového grafu je třetí kvartil. Střední část představuje medián. Spodní hranice představuje první kvartil. Tzv. vousy představují rozptyl a odlehlé hodnoty jsou zobrazeny jako jednotlivé body.

4.4.2 Oxidativní enzymy

Byla stanovena aktivita enzymů lakáza, oxidáza, peroxidáza a Mn-peroxidáza. U žádného vzorku nebyla aktivita testovaných oxidativních enzymů detekována.

4.5 Mikrobiální společenstvo na rozkládajícím se myceliu

4.5.1 Společenstvo hub na rozkládajícím se myceliu

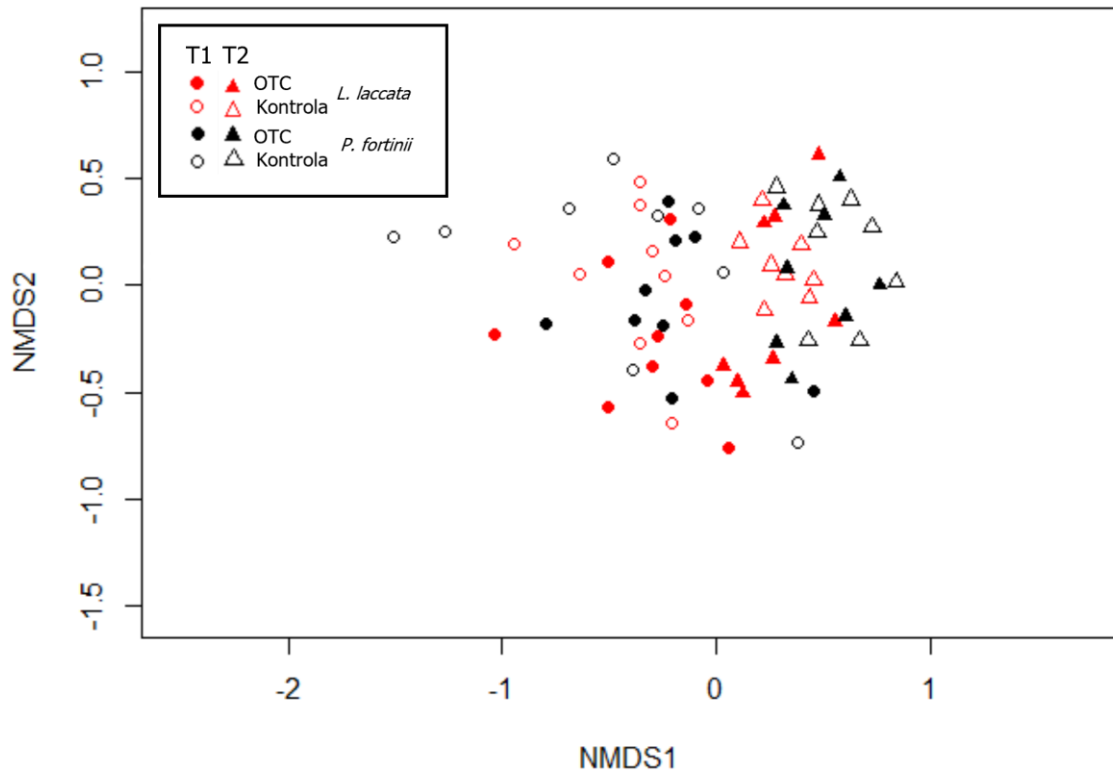
Celkově bylo získáno 1,028,516 sekvencí houbové ITS2 rDNA po kontrole kvality sekvencí a odstranění chimérických a nehoubových sekvencí. Houbové sekvence se seskupily do 3084 operačních taxonomických jednotek (OTU) s hladinou podobnosti 97 %.

Statistickou analýzou bylo testováno, zda má na změnu složení houbového společenstva v průběhu dekompozice vliv čas odběru (T1 = odběr po dvou týdnech inkubace, T2 = odběr po osmi týdnech inkubace), úroveň melanizace materiálu (hyalinní, melanizovaná), ošetření (OTC = zvýšená teplota, kontrola), vegetace (v okolí vrůstového sáčku do vzdálenosti 5 cm) a prostoru.

Na složení houbových komunit na rozkládající se hyalinní nekromase měl významný vliv čas odběru (PERMANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,18$) a ošetření (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,05$), přičemž čas odběru byl významnější. Vegetace ani prostor významný nebyl ($p > 0,05$). Na složení houbových komunit na rozkládající se melanizované nekromase měl významný vliv čas odběru (PERMANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,20$) a prostor (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,05$), přičemž čas odběru byl významnější. Vegetace ani ošetření významné nebylo ($p > 0,05$).

Na složení houbových komunit v prvním čase odběru (po dvou týdnech inkubace) měl významný vliv prostor (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,05$). Úroveň melanizace, vegetace ani ošetření významné nebylo ($p > 0,05$). Na složení houbových komunit ve druhém čase odběru (po osmi týdnech inkubace) měl významný vliv prostor (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,06$). Úroveň melanizace, vegetace ani ošetření významné nebylo ($p > 0,05$).

Tyto výsledky jsou podpořeny i NMDS analýzou (Graf 14), která ukazuje zřetelný rozdíl ve složení houbových komunit na rozkládajícím se myceliu mezi časem T1 a T2. Stejně jako PERMANOVA, ani NMDS analýza neodhalila rozdíl ve složení houbových komunit mezi melanizovaným a nemelanizovaným myceliem či myceliem inkubovaným uvnitř a vně OTC.

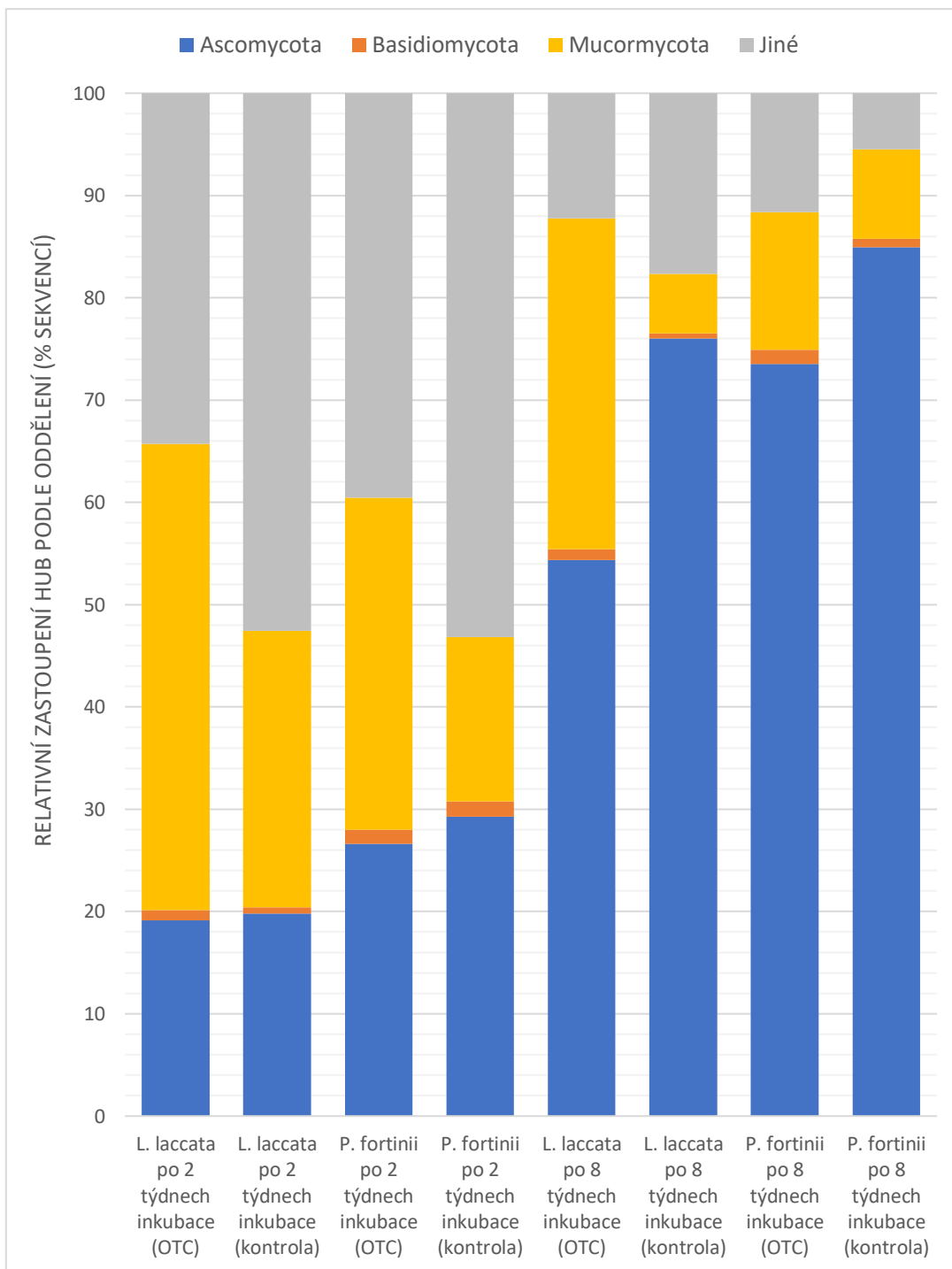


(Hodnota stresu = 0,20)

Graf č. 14: Nemetrické vícerozměrné škálování (NMDS) složení houbového společenstva
Každý bod v grafu představuje jeden vrstvý sáček (n ~ 68).

Získané sekvence byly použity pro popis složení komunity hub na rozkládajícím se houbovém myceliu.

V prvním čase odběru (po dvou týdnech inkubace) dominovaly na rozkládajícím se myceliu houby z oddělení *Mucoromycota* (30,3 %) a *Ascomycota* (23,7 %). V průběhu dekompozice houbového mycelia došlo ke změně v relativním zastoupení dominujících skupin hub. Ve druhém čase odběru (po osmi týdnech inkubace) dominovaly houby z oddělení *Ascomycota* (72,2 %). Relativní zastoupení hub ze skupiny *Mucoromycota* se snížilo (15,1 %; Graf 15).

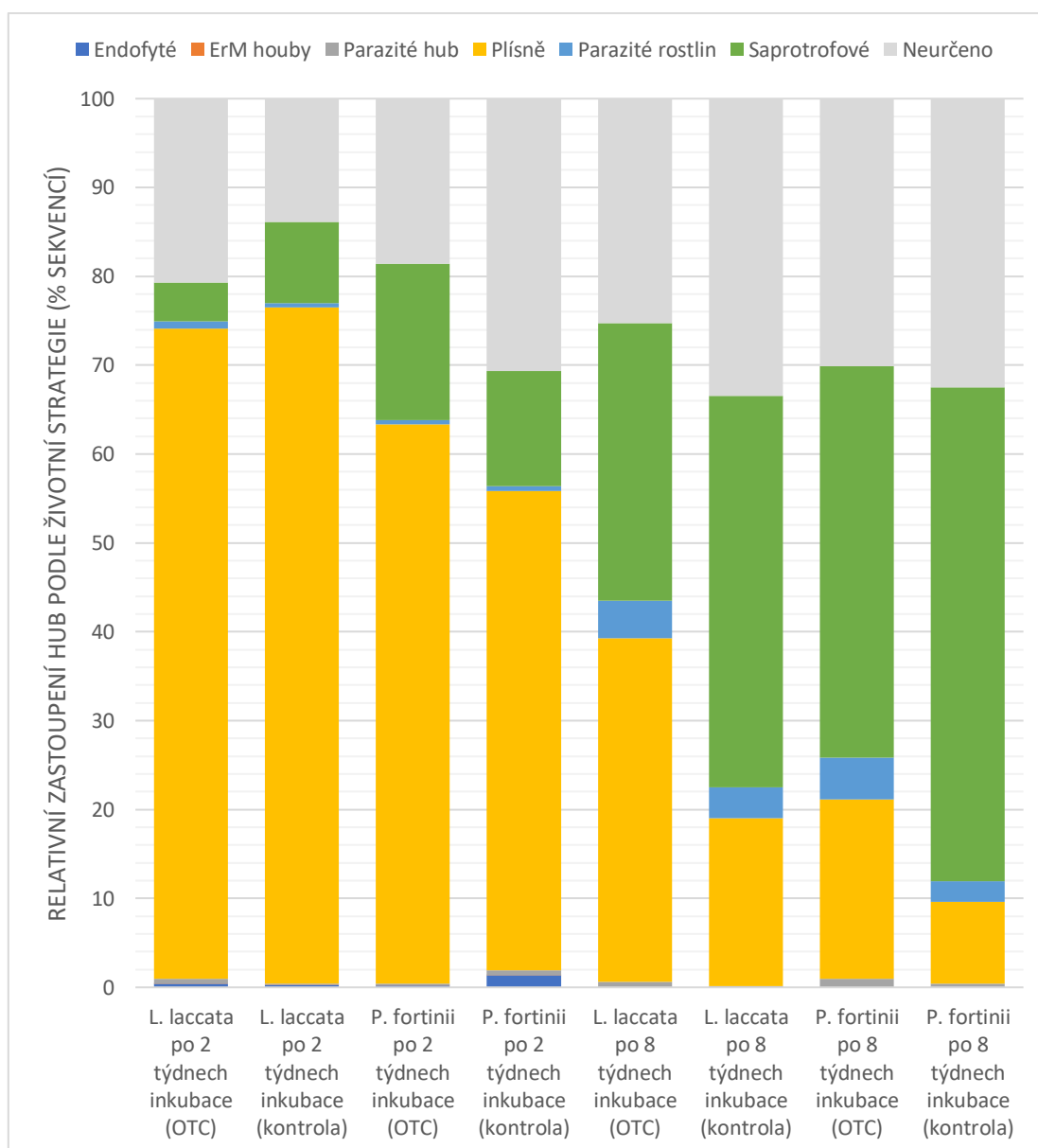


Graf č. 15: Relativní zastoupení hub podle oddělení ve vzorcích rozkládajícího se mycelia

Graf zobrazuje relativní zastoupení hub podle oddělení ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Laccaria laccata* a *Phialocephala fortinii* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace) a dvou ošetření (OTC/kontrola).

Byla provedena analýza funkční struktury houbového společenstva na rozkládajícím se myceliu. V rámci výstupu databáze FUNGuild byly houby rozděleny do několika ekologických skupin (endofyté, ErM houby, parazité hub, plísně, parazité

roślin, saprotrofové a neurčeno). V prvním čase odběru (po dvou týdnech inkubace) dominovaly na rozkládajícím se myceliu houby ze skupiny plísň (66,5 %) a saprotrofů (11 %). V průběhu dekompozice houbového mycelia došlo ke změně v relativním zastoupení dominujících ekologických skupin hub. Ve druhém čase odběru (po osmi týdnech inkubace) dominovaly houby ze skupiny saprotrofů (43,7 %) a plísň (21,7 %). V průběhu dekompozice došlo k mírnému nárůstu relativního zastoupení hub ze skupiny rostlinných parazitů z 0,6 % na 3,7 % (Graf 16).



Graf č. 16: Relativní zastoupení hub podle ekologické příslušnosti ve vzorcích rozkládajícího se mycelia

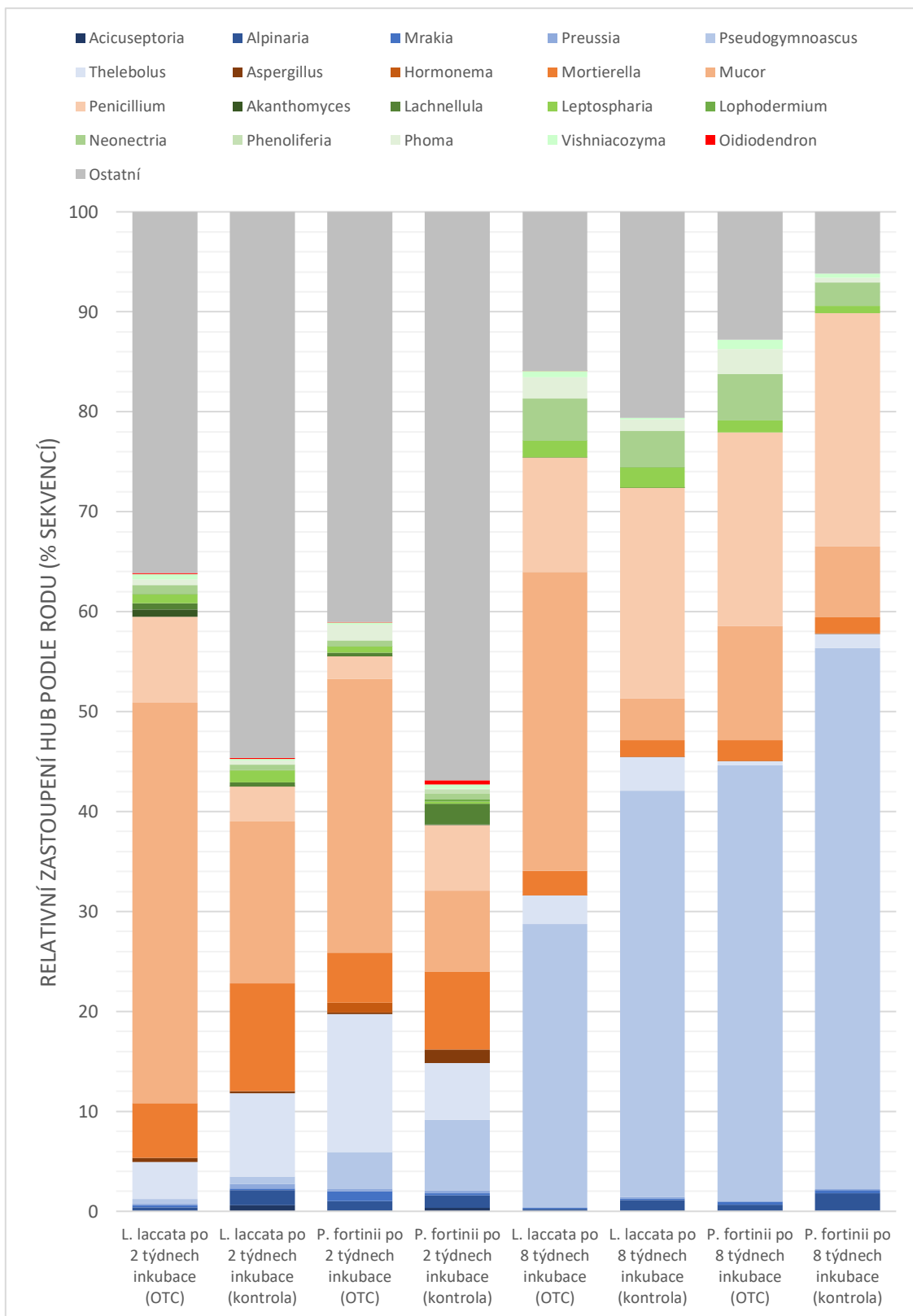
Graf zobrazuje relativní zastoupení hub podle příslušnosti k určité ekologické skupině ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Laccaria laccata* a *Phialocephala fortinii* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace) a dvou ošetření (OTC/kontrola).

V prvním čase odběru (po dvou týdnech inkubace) byly nejvíce zastoupeny houby z rodu *Mucor* (23 %), *Thelebolus* (7,9 %), *Mortierella* (7,2 %), *Penicillium* (5,2 %), *Pseudogymnoascus* (3 %) a *Alpinaria* (1 %). V průběhu dekompozice houbového mycelia došlo ke změně v relativním zastoupení dominujících rodů hub. Ve druhém čase odběru (po osmi týdnech inkubace) byly nejvíce zastoupeny houby z rodu *Pseudogymnoascus* (41,7 %), *Penicillium* (18,8 %), *Mucor* (13,1 %), *Neonectria* (3,7 %), *Thelebolus* (2 %), *Mortierella* (1,9 %), *Phoma* (1,6 %), *Leptosphaeria* (1,4 %; Graf 17).

Statistickou metodou Indicator species analysis byly zjištěny významné druhy hub na rozkládajícím se myceliu v různých zkoumaných časech ($p > 0,01$; Tab. 9).

Tabulka č. 9: Přehled indikačních houbových OTU ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Laccaria laccata* a *Phialocephala fortinii* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace)

Typ mycelia	Čas odběru	OTU	Identifikátor v NCBI	Nejpodobnější taxon	Podobnost (%)	Indikační hodnota	P hodnota
<i>Laccaria laccata</i>	2 týdny	CL0049	HQ630347	<i>Mortierella antarctica</i>	98,3	0,818	0,002
		CL0001	MG001389	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	98,6	0,961	0,001
		CL0004	AY213672	<i>Penicillium commune</i>	100	0,835	0,001
		CL0040	KT270146	<i>Neonectria major</i>	98,8	0,774	0,002
		CL0062	UDB0724674	<i>Helotiales</i> sp.	97,9	0,772	0,002
		CL0042	HG936889	<i>Ascomycota</i> sp.	100	0,751	0,003
	8 týdnů	CL0105	AY677291	<i>Nectria ramulariae</i>	98,1	0,612	0,005
<i>Phialocephala fortinii</i>	2 týdny	CL0066	UDB067633	<i>Mortierella</i> sp.	94,8	0,746	0,004
		CL0052	AF062807	<i>Oidiodendron tenuissimum</i>	97,1	0,667	0,006
	8 týdnů	CL0004	AY213672	<i>Penicillium commune</i>	100	0,763	0,007
		CL0062	UDB0724674	<i>Helotiales</i> sp.	97,9	0,717	0,005
		CL0044	KR698881	<i>Leucosporidium</i> sp.	98,6	0,67	0,005
		CL0231	MG001389	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	98,6	0,661	0,004
		CL0183	MG001389	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	98,6	0,654	0,008
	CL0046	KC965231	<i>Geopora</i> sp.	100	0,612	0,006	



Graf č. 17: Relativní zastoupení hub podle rodu ve vzorcích rozkládajícího se mycelia
 Graf zobrazuje relativní zastoupení hub podle rodu ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Laccaria laccata* a *Phialocephala fortinii* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace) a dvou ošetření (OTC/kontrola).

4.5.2 Společenstvo bakterií na rozkládajícím se myceliu

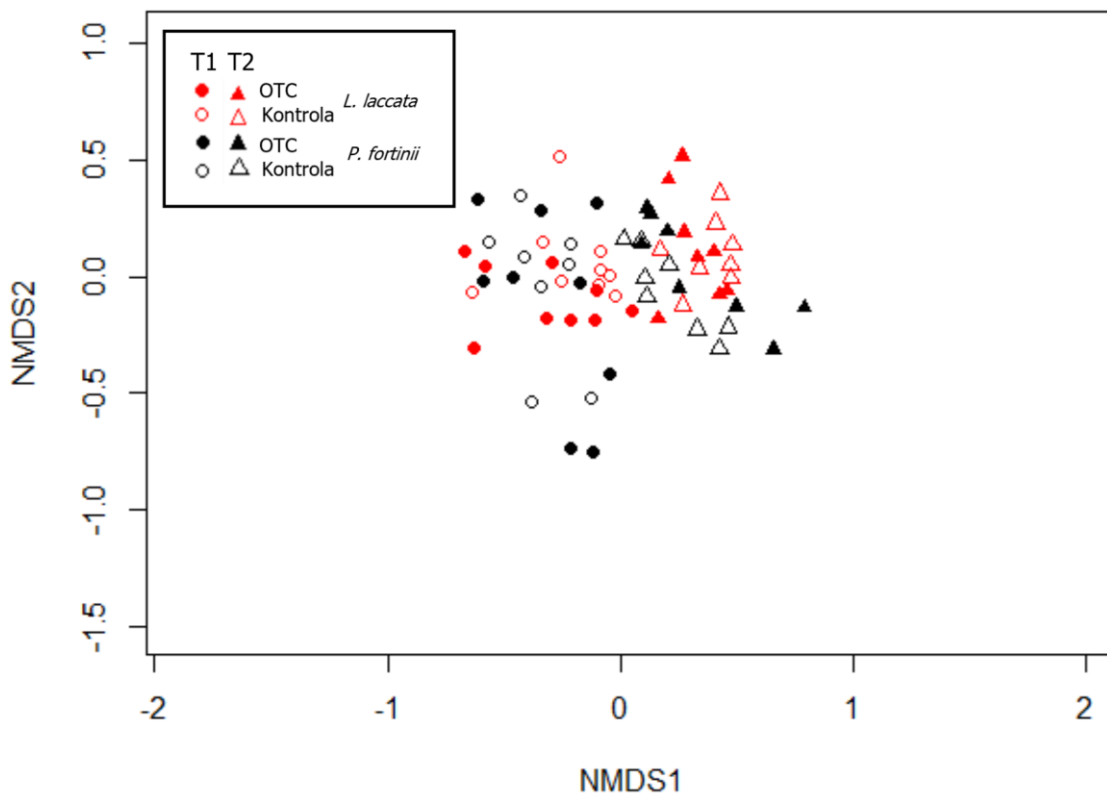
Celkově bylo získáno 1,461,825 sekvencí bakteriální 16S rDNA po kontrole kvality sekvencí a odstranění chimérických a nebakteriálních sekvencí. Bakteriální sekvence se seskupily do 5066 OTU s hladinou podobnosti 97 %.

Statistickou analýzou bylo testováno, zda má na změnu složení bakteriálního společenstva v průběhu dekompozice vliv čas odběru (T1 = odběr po 2 týdnech inkubace, T2 = odběr po 8 týdnech inkubace), úroveň melanizace materiálu (hyalinní, melanizovaná), ošetření (OTC = zvýšená teplota, kontrola), vegetace (v okolí vrůstového sáčku do vzdálenosti 5 cm) a prostoru.

Na složení bakteriálních komunit na rozkládající se hyalinní nekromase měl významný vliv čas odběru (PERMANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,24$). Vegetace, prostor ani ošetření významný vliv nemělo ($p > 0,05$). Na složení bakteriálních komunit na rozkládající se melanizované nekromase měl významný vliv čas odběru (PERMANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,21$) a prostor (PERMANOVA; $p < 0,01$; $R^2 = 0,12$), přičemž čas odběru byl významnější. Vegetace ani ošetření významné nebylo ($p > 0,05$).

Na složení bakteriálních komunit v prvním čase odběru (po 2 týdnech inkubace) měl významný vliv prostor (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,09$) a úroveň melanizace (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,05$). Vegetace ani ošetření významné nebylo ($p > 0,05$). Na složení bakteriálních komunit ve druhém čase odběru (po 8 týdnech inkubace) měla významný vliv vegetace (PERMANOVA; $p < 0,05$; $R^2 = 0,14$), prostor (PERMANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,11$) a úroveň melanizace (PERMANOVA; $p < 0,001$; $R^2 = 0,09$). Ošetření významné nebylo ($p > 0,05$).

Zřetelný rozdíl ve složení bakteriálních komunit na rozkládajícím se myceliu mezi časem T1 a T2 byl podpořen i výsledky NMDS analýzy (Graf 18). V čase T2 je zřejmý rozdíl ve složení bakteriálních komunit mezi hyalinním a melanizovaným myceliem. Tento rozdíl (ač signifikantní v PERMANOVA analýze) není NMDS analýzou v čase T1 významně podpořen.



(Hodnota stresu = 0,15)

Graf č. 18: Nemetrické vícerozměrné škálování (NMDS) složení bakteriálního společenstva

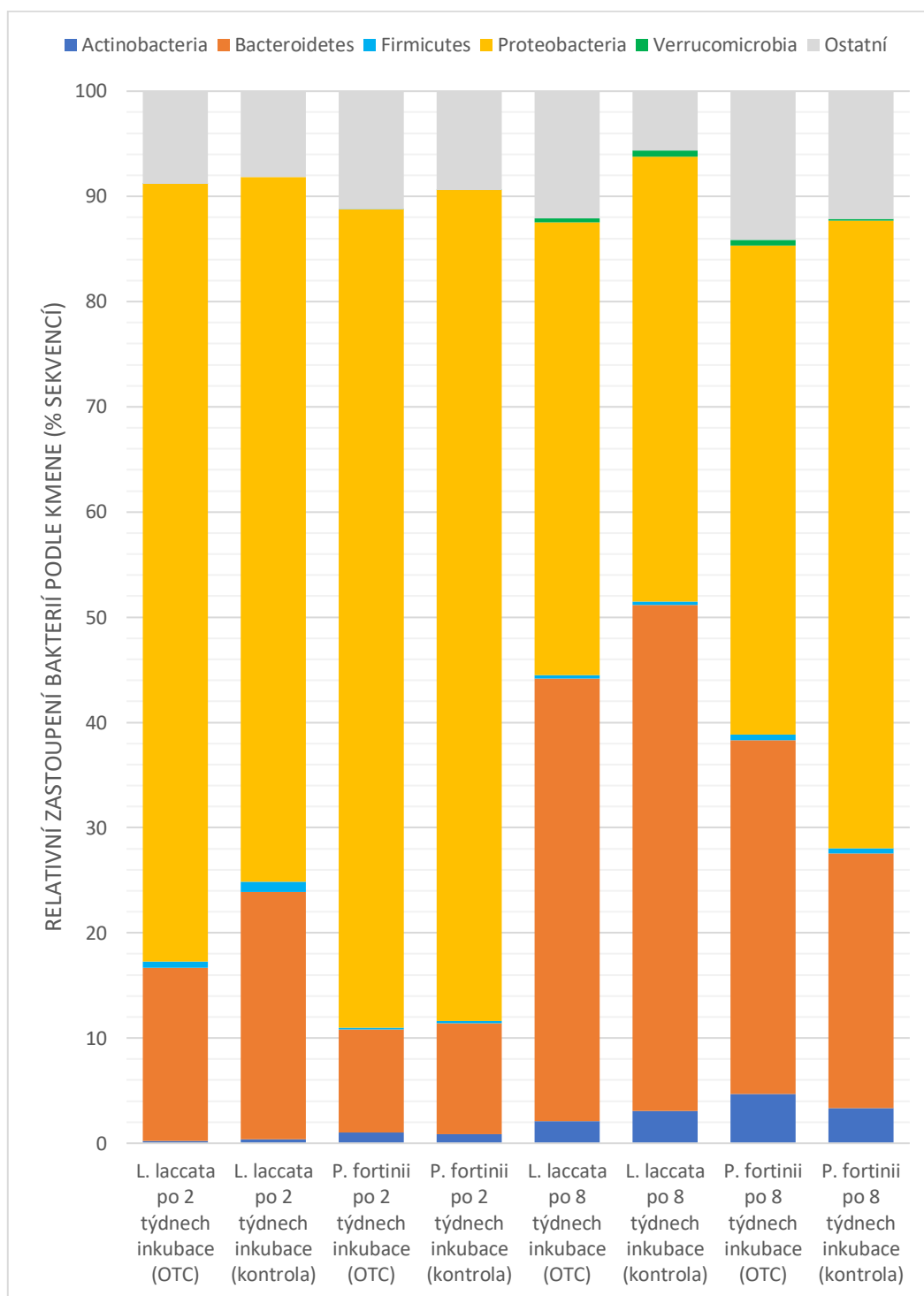
Každý bod v grafu představuje jeden vrůstový sáček (n ~ 67).

Získané sekvence byly použity pro popis složení komunity bakterií na rozkládajícím se houbovém myceliu.

V prvním čase odběru (po dvou týdnech inkubace) dominovaly na rozkládajícím se myceliu bakterie z kmene *Proteobacteria* (74,4 %) a *Bacteroidetes* (15,1 %). V průběhu dekompozice houbového mycelia došlo ke změně v relativním zastoupení dominujících skupin bakterií. Ve druhém čase odběru (po osmi týdnech inkubace) dominovaly stále bakterie z kmene *Proteobacteria* (47,9 %), ale došlo ke zdatelnému poklesu v relativním zastoupení. Naopak došlo k nárůstu relativního zastoupení bakterií z kmene *Bacteroidetes* (37 %). V průběhu dekompozice došlo k nárůstu relativního zastoupení bakterií z kmene *Actinobacteria* z 0,6 % na 3,3 % (Graf 19).

Statistickou metodou Indicator species analysis byly zjištěny významné druhy bakterií na rozkládajícím se myceliu v různých časech odběru ($p < 0,01$; Tab. 10, Tab. 11) a mezi melanizovaným a hyalinním myceliem v čase T2 ($p < 0,01$; Tab. 12).

Nejzajímavějším pozorováním je velmi významně častější detekce bakterie rodu *Chitinophaga* v melanizovaném myceliu.



Graf č. 19: Relativní zastoupení bakterií podle kmene ve vzorcích rozkládajícího se mycelia

Graf zobrazuje relativní zastoupení bakterií podle kmene ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Laccaria laccata* a *Phialocephala fortinii* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace) a dvou ošetření (OTC/kontrola).

Tabulka č. 10: Přehled indikačních bakteriálních OTU ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Laccaria laccata* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace)

Typ mycelia	Čas odběru	OTU	Identifikátor v NCBI	Nejpodobnější taxon	Podobnost (%)	Indikační hodnota	P hodnota
<i>Laccaria laccata</i>	2 týdny	CL0102	KP681251	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,3	0,799	0,002
		CL0156	KP681251	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,3	0,745	0,001
		CL0038	JN630810	<i>Luteolibacter luojiensis</i>	99,3	0,892	0,001
		CL0039	GU550556	<i>Streptomyces</i> sp.	99,6	0,891	0,001
		CL0029	KF726983	<i>Flavobacterium qiangtangense</i>	97,5	0,869	0,001
		CL0040	LN831990	<i>Caulobacter</i> sp.	99,6	0,866	0,001
		CL0035	JF915323	<i>Flavobacterium</i> sp.	99,3	0,856	0,001
		CL0036	KT803148	<i>Plantibacter</i> sp.	100	0,846	0,002
		CL0055	CP008941	<i>Paracaedibacter acanthamoebae</i>	89,6	0,838	0,001
		CL0032	KC987005	<i>Janthinobacterium</i> sp.	99,6	0,817	0,002
		CL0045	JQ977621	<i>Devosia</i> sp.	99,6	0,799	0,002
		CL0081	KJ878628	<i>Bosea</i> sp.	99,6	0,78	0,001
		CL0026	FJ464979	<i>Aeromicrobium</i> sp.	99,3	0,75	0,002
		CL0080	AB761295	<i>Xylophilus ampelinus</i>	99,3	0,75	0,001
		CL0066	KJ529062	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	99,6	0,746	0,001
		CL0052	DQ167401	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	92,6	0,732	0,001
		CL0091	KM187314	<i>Phyllobacterium</i> sp.	99,6	0,729	0,001
		CL0087	KC527667	<i>Acidovorax facilis</i>	98,6	0,723	0,005
		CL0037	JX861621	<i>Hoeflea</i> sp.	98,9	0,723	0,005
		CL0077	FR772076	<i>Flavobacterium</i> sp.	99,6	0,722	0,001
		CL0044	KC571459	<i>Taibaiella smilacinae</i>	98,6	0,707	0,002
		CL0060	KR233774	<i>Streptomyces cirratus</i>	100	0,701	0,008
		CL0063	KC505150	<i>Luteolibacter</i> sp.	99,3	0,698	0,006
		CL0064	KP762196	<i>Flavobacterium</i> sp.	98,2	0,687	0,005
		CL0030	FJ976093	<i>Protochlamydia</i> sp.	93,9	0,661	0,003
		CL0075	ABIZ01000001	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	99,3	0,661	0,003
		CL0088	GU117702	<i>Ohtaekwangia koreensis</i>	93,9	0,661	0,003
		CL0059	KJ922713	<i>Kaistia</i> sp.	99,6	0,612	0,007
		CL0100	AB267723	<i>Chitinophaga soli</i>	99,6	0,612	0,004
		CL0149	HE814743	<i>Variovorax</i> sp.	98,9	0,612	0,006
		CL0170	JX971556	<i>Devosia glacialis</i>	100	0,612	0,01
		CL0213	AB974283	<i>Variovorax</i> sp.	97,5	0,612	0,003
	CL0312	KJ642504	<i>Pseudomonas</i> sp.	97,2	0,612	0,003	

Tabulka č. 11: Přehled indikačních bakteriálních OTU ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Phialocephala fortinii* ve dvou časech odběru (dva a osm týdnů inkubace)

Typ mycelia	Čas odběru	OTU	Identifikátor v NCBI	Nejpodobnější taxon	Podobnost (%)	Indikační hodnota	P hodnota
<i>Phialocephala fortinii</i>	2 týdny	CL0151	KP681251	<i>Pseudomonas</i> sp.	99,6	0,695	0,006
		CL0040	LN831990	<i>Caulobacter</i> sp.	99,6	0,935	0,001
		CL0026	FJ464979	<i>Aeromicrobium</i> sp.	99,3	0,911	0,001
		CL0019	KM253107	<i>Chitinophaga</i> sp.	100	0,911	0,001
		CL0045	JQ977621	<i>Devosia</i> sp.	99,6	0,879	0,001
		CL0055	CP008941	<i>Paracaedibacter acanthamoebae</i>	89,6	0,866	0,001
		CL0034	KJ781978	<i>Streptomyces</i> sp.	99,6	0,863	0,001
		CL0052	DQ167401	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	92,6	0,831	0,001
		CL0044	KC571459	<i>Taibaiella smilacinae</i>	98,6	0,829	0,001
		CL0070	AB991690	<i>Albidiferax</i> sp.	100	0,791	0,001
		CL0035	JF915323	<i>Flavobacterium</i> sp.	99,3	0,776	0,002
		CL0058	HM044347	<i>Microbacterium</i> sp.	100	0,772	0,004
		CL0038	JN630810	<i>Luteolibacter luojiensis</i>	99,3	0,75	0,001
		CL0060	KR233774	<i>Streptomyces cirratus</i>	100	0,75	0,001
		CL0088	GU117702	<i>Ohtaekwangia koreensis</i>	93,9	0,75	0,001
		CL0092	KM187379	<i>Pedobacter</i> sp.	98,9	0,739	0,005
		CL0128	KP259798	<i>Rhodoglobus</i> sp.	98,9	0,72	0,001
		CL0100	AB267723	<i>Chitinophaga soli</i>	99,6	0,707	0,001
		CL0037	JX861621	<i>Hoeflea</i> sp.	98,9	0,694	0,003
		CL0066	KJ529062	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	99,6	0,69	0,005
		CL0080	AB761295	<i>Xylophilus ampelinus</i>	99,3	0,681	0,004
		CL0145	KM187251	<i>Flavobacterium</i> sp.	98,6	0,675	0,008
		CL0174	JQ977533	<i>Dyadobacter</i> sp.	99,6	0,671	0,006
		CL0039	GU550556	<i>Streptomyces</i> sp.	99,6	0,661	0,005
		CL0112	KF444795	<i>Roseococcus</i> sp.	100	0,661	0,006
		CL0086	KC247157	<i>Mucilaginibacter gynuensis</i>	99,6	0,638	0,004
		CL0030	FJ976093	<i>Protochlamydia</i> sp.	93,9	0,612	0,005
		CL0117	JQ977237	<i>Devosia</i> sp.	99,6	0,612	0,009
	CL0123	KT868783	<i>Leifsonia</i> sp.	98,6	0,612	0,009	
	CL0131	KF413428	<i>Cohnella</i> sp.	98,6	0,612	0,005	
8 týdnů	CL0205	KC878444	<i>Nocardioides endophyticus</i>	99,6	0,612	0,009	

Tabulka č. 12: Přehled indikačních bakteriálních OTU ve vzorcích rozkládajícího se mycelia hub *Phialocephala fortinii* ve druhém čase odběru (osm týdnů inkubace)

Typ mycelia	Čas odběru	OTU	Identifikátor v NCBI	Nejpodobnější taxon	Podobnost (%)	Indikační hodnota	P hodnota
<i>Phialocephala fortinii</i>	8 týdnů	CL0019	KM253107	<i>Chitinophaga</i> sp.	100	98,2	0,001

5 Diskuze

Ačkoli je toto odvětví výzkumu relativně mladé, dekompozici houbové nekromasy v půdě lesů mírného pásma a v boreálních lesů bylo již věnováno několik studií (Beidler et al., 2020; Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Certano et al., 2018; Fernandez et al., 2019; Fernandez a Kennedy, 2018; Fernandez a Koide, 2012, 2014; Maillard et al., 2020; Ryan et al., 2020), nicméně žádná studie se doposud nezabývala dekompozicí houbové nekromasy v půdě arktické tundry. Arktická tundra pokrývá plochu osm milionů km² (Tape et al., 2012). V arktických oblastech je nízká průměrná teplota, krátká vegetační sezóna a půdní procesy probíhají velmi pomalu v porovnání s ostatními ekosystémy. Dekompoziční procesy jsou pomalejší než rychlost primární produkce, což způsobuje, že jsou půdy arktických oblastí významným úložištěm uhlíku (Oechel et al., 2014). Arktické ekosystémy se během minulého století výrazně oteplily (Serreze et al., 2000) a další výrazné oteplení se očekává (ACIA, 2004). Již byly pozorovány změny v ekosystémových procesech arktických ekosystémů v reakci na oteplování, včetně zvýšené mikrobiální aktivity (Aerts, 2006; Sistla et al., 2013), rychlejšího obratu uhlíku v půdě (Shaver et al., 2006) a změny ve vegetaci (Walker et al., 2006). Proces dekompozice houbové nekromasy zasluhuje pozornost, jelikož mrtvé mycelium může reprezentovat 50 - 80 % POM a obsahovat více než 80 % dusíku v půdě (Simpson et al., 2007). Je tedy důležité určit, jak klimatická změna ovlivní proces dekompozice houbové nekromasy právě v arktické oblasti, jaké zpětnovazebné mechanismy se uplatní a jak to ovlivní cyklus živin v ekosystému. Přesné pochopení reakce arktických ekosystémů může přispět k lepší predikci důsledků klimatické změny pro ostatní ekosystémy, které se oteplují pomalejším tempem.

Převážná většina dříve provedených experimentů probíhala velmi krátkou dobu (méně než tři měsíce), přičemž byla provedena pouze chemická analýza vstupního materiálu a nebyla provedena chemická analýza zbývajících nekromasy po inkubaci, což by mohlo ukázat, jakým způsobem se mění biochemické složení nekromasy a přesněji vyvodit důsledky pro ekosystémové procesy. Pouze jedna dlouhodobá studie (dva roky) se k tomuto datu věnovala vlivu klimatické změny na dekompozici houbové nekromasy (Fernandez et al., 2019), tudíž v této oblasti jsou naše znalosti velmi omezené a je nepochybně potřeba dalšího výzkumu. Primárním cílem této práce bylo popsání možného významu klimatické změny na dekompozici houbové nekromasy v arktické tundře. Předpokládali jsme, že změna klimatu může ovlivnit rychlost dekompozice několika

způsoby. Dekompoziční procesy mohou být ovlivněny přímo, tedy zvýšenou rychlostí enzymatických procesů. Dále může dojít k nepřímému ovlivnění dekompozice, tedy skrze nárůst toku snadno dostupných energeticky bohatých látek v rámci kořenových exudátů rostlin (priming effect) či změnou ve složení komunit přítomných dekompozitorů.

Nekromasa vybraných hub (*Laccaria laccata*, *Phialocephala fortinii*) se lišila v obsahu melaninu i v poměru C:N. Mycelium *L. laccata* obsahovalo nižší množství melaninu a mělo nižší poměr C:N. Mycelium *P. fortinii* obsahovalo vyšší množství melaninu a mělo vyšší poměr C:N. Již dříve bylo prokázáno, že vyšší obsah dusíku přispívá k rozložitelnosti substrátu (Brabcova et al., 2018; Fernandez a Koide, 2012; Ryan et al., 2020). Rovněž bylo prokázáno, že vyšší obsah melaninu dramaticky zvyšuje rekalcitranci substrátu (Fernandez et al., 2019; Fernandez a Kennedy, 2018; Maillard et al., 2020; Ryan et al., 2020). Jelikož byly v našem experimentu použity pouze dva druhy hub, nelze s jistotou určit, který ze sledovaných faktorů (poměr C:N, koncentrace melaninu) se hlavní měrou podílel na pozorovaných rozdílech v rychlosti dekompozice. Krom sledovaných faktorů se nekromasa obou druhů hub může lišit i v řadě dalších faktorů, které nebyly měřeny a zahrnuty do vyhodnocení. Nicméně, v dříve publikovaných studiích bylo ukázáno, že koncentrace melaninu a poměr C:N v nekromase jsou hlavními vnitřními faktory, které ovlivňují rychlost dekompozice (Beidler et al., 2020; Fernandez et al., 2019; Fernandez a Kennedy, 2018; Fernandez a Koide, 2012, 2014; Maillard et al., 2020; Ryan et al., 2020), tudíž se dá předpokládat, že to rovněž platí v námi provedeném experimentu. V naší studii jsme pozorovali pomalejší rozklad nekromasy *P. fortinii* oproti nekromase nekromasy *L. laccata* v průběhu celé osmítýdenní inkubace. V počáteční fázi (dva týdny inkubace) probíhala dekompozice velmi rychle, jelikož dochází k dekompozici snadno rozložitelných komponent. Tato fáze je následována pomalejším rozkladem rekalcitrantní frakce materiálu. Tento trend byl již dříve pozorován pro dekompozici různých druhů hub (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018).

Vliv zvýšené teploty na dynamiku dekompozice houbové nekromasy se v osmítýdenní inkubaci neprojevil. Tento výsledek může být dán tím, že teplota byla zvýšena pasivně pouze o 1 – 3 °C, přičemž konkrétní zvýšení bylo závislé na počasí a nebylo ho možné nijak korigovat. Je rovněž možné, že osm týdnů inkubace je na projev vlivu zvýšené teploty příliš krátké období. Kompletní data týkající se počasí, teploty

vzduchu a teploty půdy v OTC a okolí ze sezóny 2019 nejsou, díky pandemii Covid-19 a nemožnosti vycestovat na experimentální lokalitu, v tuto chvíli k dispozici a není tedy možné je adekvátně posoudit. Jediná studie týkající se vlivu zvýšené teploty na dekompozici houbové nekromasy ukázala, že zvýšená teplota má pozitivní vliv na rychlost dekompozice houbové nekromasy, především tedy v zatopených prohlubních, kde docházelo vlivem zvýšené teploty k vypařování vody a lepšího přístupu půdních dekompozitorů ke kyslíku, který je potřeba k aerobním metabolickým procesům. Nicméně první odběr byl proveden až po třech měsících inkubace (Fernandez et al., 2019). Je možné, že v delším časovém úseku může dojít k projevu priming effect, který z důvodu vyšší aktivity rostlin v OTC a jejich exudaci povede ke zrychlené dekompozici rekalcitrantního materiálu, což by se mělo projevit až v momentě, kdy dojde k vyčerpání dobře dostupných živin z houbové nekromasy.

Změna obsahu melaninu v houbové nekromase v průběhu dekompozice byla výrazná. Koncentrace melaninu v nekromase *L. laccata* i *P. fortinii* se po dvou týdnech inkubace významně zvýšila, což odpovídalo očekávání (Ryan et al., 2020). Ke zvýšení došlo pravděpodobně v důsledku rychlého rozkladu snadno rozložitelných látek. Po dalších šesti týdnech inkubace se koncentrace melaninu výrazně nezměnila, ale u nekromasy *P. fortinii* měla koncentrace melaninu tendenci klesat. Vliv zvýšené teploty na obsah melaninu v nekromase se projevil pouze u nekromasy *L. laccata* po dvou týdnech inkubace. Nekromasa inkubovaná v OTC obsahovala výrazně větší obsah melaninu než nekromasa inkubovaná v ambientních podmínkách. To je pravděpodobně způsobeno efektivnějším rozkladem snadno dostupných substrátů v podmínkách zvýšené teploty zvýšenou aktivitou přítomných dekompozitorů. Nicméně na celkovém snížení hmotnosti nekromasy se tento efekt neprojevil.

Poměr C:N v nekromase *L. laccata* stoupal v průběhu celé dekompozice, což odpovídá výsledkům předešlé studie, která se věnovala změnám v chemickém složení nekromasy během dekompozice, která trvala 90 dnů (Ryan et al., 2020). K tomu pravděpodobně došlo v důsledku rozkladu snadno dostupných substrátů, které obsahují dusík (proteiny, chitin), aktivitou rychle rostoucích mikroorganismů. Půdy arktické tundry jsou typicky limitované dostupností dusíku (Sistla et al., 2012), a proto není překvapivé, že se dekompozitori soustředí zejména na získávání dusíku, čímž dochází ke stoupaní poměru C:N během dekompozice. Poměr C:N v nekromase *P. fortinii* se v průběhu celé dekompozice nezměnil, což pravděpodobně ukazuje na celkově nízkou

atraktivitu výchozího substrátu pro přítomnou komunitu dekompozitorů. Tento výsledek je v souladu s publikovanou literaturou (Ryan et al., 2020), kde byly sledovány změny chemického složení nekromasy dvou melanizovaných druhů hub (*Cenococcum geophilum* a *Meliniomyces bicolor*). Nekromasa *C. geophilum* měla vyšší počáteční obsah dusíku (cca 5 %) než nekromasa *M. bicolor* (cca 3 %). Po devadesátidenní inkubaci obsah dusíku v nekromase *C. geophilum* výrazně poklesl, kdežto obsah dusíku v nekromase *M. bicolor* zůstal beze změny. Nekromasa *P. fortinii* (3,13 % N), která byla použita v této práci, biochemickým složením více odpovídala *M. bicolor*, a proto není překvapivé, že se výsledky shodují. Je nutné podotknout, že žádná z doposud publikovaných studií týkající se dekompozice houbové nekromasy nepracovala přímo s myceliem *P. fortinii*. Pro vysvětlení těchto rozdílů ve změnách chemického složení houbové nekromasy během dekompozice navrhuji v dalším výzkumu použít mycelia více druhů hub s různou úrovní melanizace a různým počátečním poměrem C:N. Rovněž by bylo vhodné experiment provést v různých ekosystémech pro stejné druhy hub, což by přispělo k poznání vlivu různých biotických a abiotických podmínek konkrétních ekosystémů.

Současné znalosti týkající se procesu dekompozice houbové nekromasy jsou ve srovnání se znalostmi v oblasti dekompozice rostlinné nekromasy velmi omezené (Fernandez et al., 2016). Ví se, že některé komponenty buněčné stěny hub podléhají rozkladu aktivitou stejných extracelulárních enzymů jako komponenty buněčné stěny rostlin. β glukany jsou rozložitelné stejnými enzymy jako rostlinná celulóza (β glukosidázy). Proteiny jsou rozložitelné hydrolytickými enzymy proteázami. Melaniny jsou rozložitelné nespecifickými oxidativními enzymy, které se typicky účastní dekompozice rostlinného ligninu (peroxidázy). Chitin je komponentou buněčné stěny hub, která nemá analog v buněčné stěně rostlin. Chitin je rozložitelný aktivitou chitinázových enzymů, jejichž produkce může vyžadovat určitou specializaci na dekompozici houbové nekromasy obsahující chitin (Adams, 2004).

Aktivita hydrolytických enzymů (β -glukosidáza, fosfomonoesteráza, β -xylosidáza, N-acetylglukosaminidáza, celobiohydroláza, β -galaktosidáza, α -glukosidáza a lipáza) byla detekována již ve vstupním materiálu, což pravděpodobně reprezentuje enzymovou aktivitu mycelia *L. laccata* a *P. fortinii*, nikoli enzymovou aktivitu vyvolanou rozkladem materiálu. U enzymů, jejichž aktivita byla v počátečním materiálu vysoká a v průběhu dekompozice klesala nebo se neměnila, nelze spolehlivě určit, zda se jedná o rozklad těchto proteinů nebo zda je v tom zahrnuta enzymová aktivita přítomné

komunity dekompozitorů. Aktivita enzymu fosfomonoesteráza v průběhu dekompozice klesala na myceliu *L. laccata*, kdežto aktivita na myceliu *P. fortinii* se neměnila, což pravděpodobně značí fosfomonoesterázovou aktivitu přítomných dekompozitorů na myceliu *P. fortinii*. Enzymy s fosfomonoesterázovou aktivitou jsou běžně používány půdními mikroorganismy pro přístup k organicky vázanému fosforu (Kunito et al., 2012; Pang a Kolenko, 1986). Aktivita enzymu β -xylosidáza a α -glukosidáza v průběhu dekompozice poklesla na myceliu *P. fortinii*, kdežto aktivita enzymu β -xylosidáza na myceliu *L. laccata* zůstala beze změny a aktivita enzymu α -glukosidáza se zvýšila oproti hodnotám výchozího materiálu. β -xylosidáza hydrolyzuje odštěpení zbytků xylózy, což je sacharid typický pro rostlinné hemicelulózy (Scheller et al., 2010), ale v buněčné stěně hub se nevyskytuje. Je tedy překvapivé, že by se na rozkladu houbové nekromasy enzym β -xylosidáza podílel. Je ovšem možné, že zrcadlí aktivitu jiného hydrolytického enzymu, který se na dekompozici houbové nekromasy aktivně podílí, což bylo dříve diskutováno (Brabcova et al., 2018). Enzym α -glukosidáza se účastní štěpení α -(1,4)-glykosidických vazeb mezi glukózovými jednotkami sacharidů například u škrobu (Tomasik a Horton, 2012) nebo glykogenu. U nekromasy hub to může značit rozklad glykogenu, který je běžným rezervním materiálem hub. Aktivita enzymu N-acetylglukosaminidáza v průběhu dekompozice poklesla na myceliu *L. laccata*, ale na myceliu *P. fortinii* měla tendenci stoupat v pozdější fázi inkubace. N-acetylglukosaminidáza je enzym účastnící se hydrolytického rozkladu glykosidických vazeb v chitinu (Adams, 2004), což je důležitou komponentou buněčné stěny hub. U enzymu lipáza lze spolehlivě říci, že výrazné zvýšení enzymové aktivity v průběhu dekompozice je způsobeno aktivitou přítomných dekompozitorů. To značí, že je houbové mycelium důležitým zdrojem lipidů v prostředí. Lipáza je enzym katalyzující hydrolyzu tuků, přičemž konvertuje triglyceridy na monoglyceridy a mastné kyseliny. Toto zjištění je v souladu se studií, kde byla analyzována enzymová aktivita na rozkládajících se plodnicích *Tylophilus felleus* v lese mírného pásma (Brabcova et al., 2016). Další studie věnující se enzymové aktivitě na rozkládajících se plodnicích více druhů hub (*Amanita sp.*, *Cortinarius sp.*, *Clitocybe nebularis*, *Lactarius helvus*, *Trametes versicolor*, *Mycena galericulus*, *Agaricus campestris*, *Hypholoma fasciculare*, *Armillaria gallica*, *Russula sp.*, *Russula ochroleuca*, *Tylophilus felleus*) neobsahuje hodnoty enzymové aktivity vstupního materiálu (Brabcova et al., 2018). Z tohoto důvodu nelze výsledky relevantně porovnat s výsledky této práce. V ostatních studiích, které se doposud věnovaly

dekompozici houbové nekromasy, nebyly aktivity hydrolytických enzymů stanoveny a další výzkum je v této oblasti nezbytný.

Aktivita oxidativních enzymů (lakáza, peroxidáza a Mn-peroxidáza) nebyla detekována u vstupního materiálu ani během celé osmi týdenní inkubace. To může být způsobeno tím, že ani po osmi týdnech nezačal významný rozklad melaninu, který podléhá katabolismu pouze za přítomnosti nespecifických oxidativních enzymů. Tuto domněnku podporuje i fakt, že obsah melaninu v průběhu dekompozice stoupal, jak v této, tak i v již publikované studii (Ryan et al., 2020). Žádná doposud publikovaná studie, která se věnuje dekompozici houbové nekromasy, nepoužila tuto metodu stanovení aktivity oxidativních enzymů, tudíž není možné výsledky této práce porovnat s výsledky jiných prací.

Rostoucí počet studií se nyní zaměřuje na biogeografii mikroorganismů po celém světě (Delgado-Baquerizo et al., 2018; Tedersoo et al., 2014; Vetrovsky et al., 2019), ale arktické oblasti se doposud věnovala poměrně malá pozornost ve srovnání s jinými ekosystémy. To je zapříčiněno zejména náročností s odebráním vzorků v arktických oblastech. Konkrétně tématu mikrobiální diverzity v oblasti souostroví Svalbard bylo k tomuto publikováno jen několik málo studií (Neufeld a Mohn, 2005; Schostag et al., 2015; Tveit et al., 2013; Zhang et al., 2016). Komunita půdních hub je obecně dominovaná houbami z oddělení *Ascomycota* a *Basidiomycota*, které jsou dekompozitory v terestrických ekosystémech. Konkrétně v půdě na souostroví Svalbard dominují houby z oddělení *Ascomycota* (až 80 %) (Wallenstein et al., 2007; Zhang et al., 2016).

Houby, které byly detekovány na rozkládajícím se myceliu během osmitýdenní inkubace byly převážně identifikovány jako plísně a saprotrofní houby, přičemž se jejich relativní zastoupení v průběhu dekompozice měnilo. Na rozkládajícím se myceliu po dvou týdnech inkubace dominovaly houby ze skupiny rychle rostoucích plísní (66,5 %) a saprotrofních hub (11 %). Po osmi týdnech inkubace dominovaly houby ze skupiny saprotrofních hub (43,7 %) a plísní (21,7 %). V průběhu dekompozice došlo k nárůstu relativního zastoupení hub ze skupiny rostlinných parazitů z 0,6 % na 3,7 %.

Z hub detekovaných na rozkládajícím se myceliu byly nejčastěji detekovány zástupci dvou oddělení *Mucoromycota* a *Ascomycota*. Po dvou týdnech inkubace měly vyšší relativní zastoupení houby z oddělení *Mucoromycota* (30,3 %) než z oddělení *Ascomycota* (23,7 %). Po osmi týdnech inkubace měly vyšší relativní zastoupení houby z oddělení *Ascomycota* (72,2 %) než z oddělení *Mucoromycota* (15,1 %). Houby

z oddělení *Basidiomycota* byly zastoupeny minoritně, což je pravděpodobně způsobeno tím, že se účastní především rozkladu rekalitrantních složek nekromasy, která v tomto bodě nezapočala, s čímž koresponduje stoupající obsah melaninu a nedetekovatelná aktivita oxidativních enzymů na rozkládajícím se myceliu v průběhu osmitýdenní inkubace. Houby z oddělení *Mucoromycota* jsou typicky rychle rostoucí saprotrofové. Houby z oddělení *Ascomycota* mají různé ekologické úlohy v prostředí, mezi něž patří i saprotrofní způsob života (Baldrian et al., 2011; Osono, 2007). Vzhledem k tomu, že houby z oddělení *Ascomycota* obecně dominují v půdě na souostroví Svalbard není překvapivé, že se účastní dekompozičních procesů a jejich relativní zastoupení v průběhu inkubace vzrostlo. Přítomnost těchto tří oddělení (*Mucoromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*) byla na rozkládajícím se myceliu patrná po celou dobu inkubace, přičemž se v čase měnilo pouze relativní zastoupení jednotlivých oddělení.

V prvním čase odběru dominovaly na obou typech mycelia houby rodu *Mortierella* patřící do oddělení *Mucoromycota*, což jsou typicky rychle rostoucí plísňe. Houby rodu *Mortierella* byly již dříve identifikovány jako jedni z primárních kolonizátorů houbové nekromasy v lesích mírného pásu a boreálních lesích (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez a Kennedy, 2018) a evidentně je tomu tak i v chladných arktických oblastech, odkud byly izolovány psychrooligotrofní druhy rodu *Mortierella* (Bergero et al., 1999). Již publikované studie ukazují, že v počátečních fázích dekompozice kolonizují houbovou nekromasu převážně oportunní houby, u nichž se předpokládá, že mohou rychle využít relativně velkou část rozpustných a hydrolyzovatelných látek bez ohledu na kvalitu substrátu (Fernandez a Kennedy, 2018). Ve druhém čase odběru dominovaly na obou typech mycelia houby rodu *Pseudogymnoascus* patřící do oddělení *Ascomycota*, což jsou saprotrofní houby, které se běžně vyskytují v půdě chladné arktické oblasti (Bergero et al., 1999; Rice a Currah, 2006). Houby rodu *Pseudogymnoascus* produkují širokou škálu extracelulárních enzymů, jako jsou lipázy, chitinázy a celulózy, což svědčí o jejich schopnosti účastnit se dekompozice rostlinné a houbové nekromasy. Navíc bylo ukázáno, že houby rodu *Pseudogymnoascus* dokáží růst na fulvonových a huminových kyselinách (Reynolds a Barton, 2014), což naznačuje, že by se mohly účastnit i degradace rekalitrantního materiálu. Fernandez a Kennedy (2018) detekovali houby rodu *Pseudogymnoascus* na rozkládajícím se houbové nekromase v boreálním lese jen v nepatrném množství v rámci celé tříměsíční inkubace. V lesích mírného pásu nebyly houby rodu

Pseudogymnoascus detekovány na rozkládajícím se myceliu vůbec (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018). Je tedy možné, že houby rodu *Pseudogymnoascus* mohou být typickými dekompozitory houbové nekromasy v arktických oblastech.

Studie publikovaná v roce 2018 sledovala složení mikrobiálních komunit na hyalinním a melanizovaném myceliu mykorhizní houby *M. bicolor* v boreálním lese (Fernandez a Kennedy, 2018). Nejvíce abundantní rody hub byly *Tomentella*, *Penicillium*, *Mortierella*, *Epicoccum* a *Russula*. V této studii se ukázal rozdíl v melanizaci mycelia jako významný faktor pro složení houbových komunit. Na hyalinní nekromase převládaly houby ze skupiny rychle rostoucích plísní a kvasinek (první měsíc inkubace), které byly v pozdější fázi inkubace nahrazeny EcM houbami (třetí měsíc inkubace). Na melanizované nekromase kodominovaly houby ze skupiny plísní, kvasinek a EcM hub po celou dobu tříměsíční inkubace. Autoři tento rozdíl vysvětlují tak, že rekalitrantní povaha melanizované nekromasy může bránit převládnutí jedné ekologické skupiny na substrátu. Studie publikovaná v roce 2020 sledovala dekompozici nekromasy saprotrofní houby *Mortierella elongata* a mykorhizní houby *M. bicolor* v půdě a tlejícím dřevě v boreálním lese (Maillard et al., 2020). *M. elongata* reprezentovala hyalinní materiál s nižším poměrem C:N, kdežto *M. bicolor* reprezentovala melanizovaný materiál s vyšším poměrem C:N. V časně fázi dekompozice probíhala kolonizace rychle rostoucími oportunními houbami, po níž následovala kolonizace houbami s vyšší schopností degradovat rekalitrantní substráty, mezi něž patřily houby bílé hniloby a EcM houby. Tento trend byl sledován u obou typů nekromasy. Zmíněné publikované výsledky nejsou v souladu s výsledky našeho experimentu, kdy typ mycelia neměl v průběhu osmitýdenní inkubace zásadní vliv na složení komunit hub. Rozdílné výsledky mohou být dány různými biotickými a abiotickými faktory konkrétního ekosystému, kde byly experimenty provedeny (boreální les a arktická tundra). Dále je nutno podotknout, že byly v rámci experimentů testovány rozdílné druhy hub s různým biochemickým složením a rovněž mohou mít vliv i nesledované faktory.

Recentně publikované studie ukazují, že nejen houby, ale i bakterie jsou schopné rychle kolonizovat houbovou nekromasu (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018), přičemž bylo poukázáno na fakt, že by bakterie mohly hrát dokonce významnější roli při dekompozici houbové nekromasy než houby (Lopez-Mondejar et al., 2018), ačkoli experimentálních dat je stále poměrně málo. Již dříve bylo zjištěno, že bakterie produkují

enzymy degradující komponenty buněčné stěny rostlin, čímž se významnou měrou podílejí na dekompozici rostlinné nekromasy (Berlemont a Martiny, 2015; Brown a Chang, 2014; Lopez-Mondejar et al., 2016). Vzhledem k určité podobnosti rostlinné a houbové nekromasy je logické předpokládat, že se významným způsobem podílejí na dekompozici houbové nekromasy.

Během našeho experimentu byly na houbové nekromase detekovány převážně bakterie z kmene *Proteobacteria* a *Bacteroidetes*. V průběhu celé inkubace měly nejvyšší relativní zastoupení bakterie z kmene *Proteobacteria*, ale relativní zastoupení v čase pokleslo z 74,4 % na 47,9 %. Dále byl zaznamenán nárůst v relativním zastoupení bakterií z kmene *Bacteroidetes* z 15,1 % na 37 %. Rovněž byl detekován mírný nárůst v relativním zastoupení bakterií z kmene *Actinobacteria* z 0,6 % na 3,3 %. Bakterie z kmene *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* se běžně v půdách arktické tundry vyskytují (Malard a Pearce, 2018).

Brabcová et al. (2018) ukazují podobný trend, kdy v počáteční fázi dekompozice houbové nekromasy v lese mírného pásu dominovaly bakterie z kmene *Proteobacteria* a *Bacteroidetes* a v pozdější fázi převládly bakterie z kmene *Bacteroidetes*, přičemž bakterie z kmene *Actinobacteria* byly rovněž přítomné.

V našem experimentu se v prvním čase odběru na obou typech mycelia ukázaly jako významné bakterie rodu *Pseudomonas* z kmene *Proteobacteria*. Bakterie rodu *Pseudomonas* typicky adherují k živým houbovým hyfám (Warmink et al., 2009), navíc produkují širokou škálu extracelulárních enzymů (Janssen, 2006), včetně chitináz (Wang et al., 2010), což svědčí o jejich schopnosti podílet se na dekompozici houbové nekromasy. Nejzajímavějším pozorováním je častější detekce bakterie rodu *Chitinophaga* z kmene *Bacteroidetes* na melanizovaném myceliu ve druhém čase odběru. Bakterie z rodu *Chitinophaga* produkují mimo jiné celou řadu extracelulárních enzymů s chitinázovou aktivitou, které mohou využívat pro degradaci houbové nekromasy (Del Rio et al., 2010; Sangkhobol a Skerman, 1981). Navíc bylo ukázáno, že bakterie rodu *Chitinophaga* dokáží degradovat rostlinné glukany (McKee a Brumer, 2015), tudíž se dá předpokládat, že se mohou rovněž účastnit dekompozice houbových glukánů. Přítomnost bakterií rodu *Pseudomonas* a *Chitinophaga* na rozkládajícím se myceliu již byla ukázána v dříve publikované literatuře (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez a Kennedy, 2018). Fernandez a Kennedy (2018) ve své studii rovněž ukázali významně častější výskyt bakterií rodu *Chitinophaga* na melanizovaném než na hyalinním myceliu

mykorhizní houby *M. bicolor* v boreálním lese, což ukazuje na schopnost kolonizovat hůře rozložitelnou houbovou nekromasu.

Z důvodu nedostatku experimentálních dat je potřeba výsledky interpretovat s určitou opatrností, avšak zdá se, že se dekompozice houbové nekromasy účastní podobné komunity bakterií napříč ekosystémy.

Závěr

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na proces dekompozice houbové nekromasy v arktické tundře (konkrétně souostroví Svalbard) pod faktorem klimatické změny (simulovaná zvýšením teploty uvnitř OTC). Byla sledována dynamika dekompozice mycelia dvou vybraných druhů hub, které se liší ve svém biochemickém složení (koncentrace melaninu a poměr C:N v substrátu). Endofytická houba *Phialocephala fortinii* byla zvolena jako melanizovaný zástupce s vyšším poměrem C:N. Ektomykorhizní houba *Laccaria laccata* byla zvolena jako hyalinní zástupce s nižším poměrem C:N. V průběhu dekompozice houbového mycelia byla sledována úroveň enzymové aktivity a změny v obsahu melaninu a poměru C:N. Dále byla na rozkládajícím se myceliu sledována sukcese společenstva hub a bakterií na rozkládajícím se myceliu. Cílem této diplomové práce bylo především rozšířit současné znalosti o vlivu probíhající klimatické změny na dekompozici houbové nekromasy v arktické tundře.

Výsledky této práce ukazují, že biochemické složení houbové nekromasy je důležitým parametrem určujícím rychlost dekompozice houbové nekromasy v půdě arktické tundry. Vyšší koncentrace melaninu a vyšší poměr C:N zvyšuje rekalitranci substrátu a činí ho nesnadno degradovatelným a celkově méně atraktivním pro přítomnou komunitu mikrobiálních dekompozitorů (Beidler et al., 2020; Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez et al., 2019; Fernandez a Koide, 2012, 2014; Fernandez et al., 2016a; Maillard et al., 2020; Ryan et al., 2020). V našem experimentu se biochemické složení nekromasy ukázalo jako nevýznamné pro složení houbové komunity, která byla detekovaná na rozkládajícím se myceliu. Hlavním faktorem určující změny ve složení komunity hub na rozkládajícím se myceliu byla doba inkubace. V počáteční fázi dekompozice byly na obou typech mycelia nejvíce zastoupeny houby rodu *Mortierella*, které byly již dříve identifikovány jako jedni z primárních kolonizátorů houbové nekromasy v různých ekosystémech (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez a Kennedy, 2018). V pozdější fázi dekompozice byly významně častěji detekovány houby rodu *Pseudogymnoascus*, což jsou saprotrofní houby typické pro chladné arktické oblasti (Bergero et al., 1999; Rice a Currah, 2006), které jsou schopné svou enzymovou vybaveností degradovat rostlinný a houbový materiál více perzistentní povahy (Reynolds a Barton, 2014). V dříve provedených experimentech v lesích mírného pásu a boreálních lesích byly houby rodu *Pseudogymnoascus* na rozkládajícím se myceliu detekovány jen minimálně nebo vůbec (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018;

Fernandez a Kennedy, 2018), což značí, že by se mohlo jednat o kolonizátory houbové nekromasy typicky v arktických oblastech. Vliv doby inkubace a biochemického složení byl na složení bakteriální komunity asociované s rozkládajícím se myceliem významný. V počáteční fázi dekompozice byly na obou typech mycelia nejvíce zastoupeny bakterie rodu *Pseudomonas*, které produkují mimo jiné enzymy s chitinázovou aktivitou (Janssen, 2006; Wang et al., 2010). Bakterie rodu *Chitinophaga* byly významně častěji detekovány na rozkládajícím se melanizovaném myceliu v pozdější fázi dekompozice, což bylo již dříve ukázáno pro kolonizaci houbové nekromasy v boreálních lesech (Fernandez a Kennedy, 2018). Bakterie rodu *Chitinophaga* mají enzymovou vybavenost pro degradaci chitinu a různých glukánů (Del Rio et al., 2010; McKee a Brumer, 2015; Sangkhobol and Skerman, 1981). Bakterie rodu *Pseudomonas* i *Chitinophaga* byly již dříve identifikovány na rozkládající se houbové nekromase (Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez and Kennedy, 2018). V počáteční fázi dekompozice osídlují nově vzniklou nekromasu převážně rychle rostoucí oportunní r-strategické mikroorganismy, které jsou schopné využít snadno degradovatelné látky. Po vyčerpání snadno rozložitelného materiálu se uplatňují saprotrofní mikroorganismy s vyšší enzymovou vybaveností, které jsou schopné využívat i materiál více perzistentní povahy (Baldrian, 2017; Brabcova et al., 2016; Brabcova et al., 2018; Fernandez a Kennedy, 2018). Zvýšená teplota v OTC a vyšší primární produktivita vegetace (priming effect) neměla v rámci osmitýdenní inkubace významný vliv na dynamiku dekompozice houbové nekromasy a na složení mikrobiálních společenstev. Probíhající změna klimatu tedy pravděpodobně významně neovlivňuje počáteční fázi dekompozice houbové nekromasy v půdě arktické tundry. K tomuto datu nebylo provedeno mnoho studií, které by se týkaly vlivu klimatické změny na dekompozici houbové nekromasy a další výzkum je nepochybně potřeba. Je důležité věnovat tomuto tématu více pozornosti, jelikož dekompozice houbové nekromasy je důležitým procesem v prostředí a přispívá nezanedbatelnou měrou ke globálnímu cyklu uhlíku a tvorbě POM (Clemmensen et al., 2015; Clemmensen et al., 2013). Vzhledem k rozsahu probíhající klimatické změny, která se dotýká všech ekosystémů naší planety, je podstatné určit, jak hlavní faktory klimatické změny ovlivňují komunitu půdních mikroorganismů, které zastávají významné ekosystémové služby (Vetrovsky et al., 2019). Půdy arktických oblastí jsou významným úložištěm uhlíku na planetě, jelikož je rychlost primární produkce vyšší než rychlost dekompozice (Oechel et al., 2014). Předpokládá se, že další oteplování způsobí zvýšení

rychlosti půdní respirace, čímž by mohlo dojít k pozitivní zpětné vazbě ekosystémů a z půd nejen arktických oblastí by se mohl stát zdroj CO₂ a dalšího oteplování (Plattner et al., 2008). Je proto nezbytné dalším výzkumem prohlubovat znalosti týkající se dekompozice houbové nekromasy, jelikož to povede k lepšímu pochopení celkového fungování ekosystémů a k přesnější predikci dalšího vývoje klimatu na planetě.

Seznam použité literatury

- Abuzinadah, R., Finlay, R., and Read, D. (1986). The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants .2. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*. *New Phytologist* 103, 495-506.
- ACIA (2004). Impacts of a Warming Arctic: Arctic Climate Impact Assessment. ACIA Overview report. Cambridge University Press 140.
- Adams, D. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, 2029-2035.
- Adeoyo, O., Pletschke, B., and Dames, J. (2019). Molecular identification and antibacterial properties of an ericoid associated mycorrhizal fungus. *BMC Microbiology* 19, 178.
- Aerts, R. (1997). Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: A triangular relationship. *Oikos* 79, 439-449.
- Aerts, R. (2006). The freezer defrosting: global warming and litter decomposition rates in cold biomes. *Journal of Ecology* 94, 713-724.
- Allen, M.F., and Kitajima, K. (2013). In situ high-frequency observations of mycorrhizas. *New Phytologist* 200, 222-228.
- Allen, M.F., and Kitajima, K. (2014). Net primary production of ectomycorrhizas in a California forest. *Fungal Ecology* 10, 81-90.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Averill, C., Turner, B.L., and Finzi, A.C. (2014). Mycorrhiza-mediated competition between plants and decomposers drives soil carbon storage. *Nature* 505, 543.
- Baldrian, P. (2017). Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest soils. *Current Opinion in Microbiology* 37, 128-134.
- Baldrian, P., Voriskova, J., Dobiasova, P., Merhautova, V., Lisa, L., and Valaskova, V. (2011). Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil* 338, 111-125.
- Bartnick.S (1968). Cell wall chemistry morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Review of Microbiology* 22, 87.
- Beidler, K., Phillips, R., Andrews, E., Maillard, F., Mushinski, R., and Kennedy, P. (2020). Substrate quality drives fungal necromass decay and decomposer community structure under contrasting vegetation types. *Journal of Ecology* 2020;00:1-15.
- Bell, A., and Wheeler, M. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24, 411-451.
- Bending, G., and Read, D. (1995). The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. 5. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytologist* 130, 401-409.
- Bergero, R., Girlanda, M., Varese, G., Intili, D., and Luppi, A. (1999). Psychrooligotrophic fungi from Arctic soils of Franz Joseph Land. *Polar Biology* 21, 361-368.
- Berlemont, R., and Martiny, A. (2015). Genomic potential for polysaccharide deconstruction in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1513-1519.
- Billes, G., Rouhier, H., and Bottner, P. (1993). Modifications of the carbon and nitrogen allocations in the plant (*Triticum aestivum L.*) soil system in response to increased atmospheric CO₂ concentration. *Plant and Soil* 157, 215-225.

- Bodeker, I., Clemmensen, K., de Boer, W., Martin, F., Olson, A., and Lindahl, B. (2014). Ectomycorrhizal *Cortinarius* species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems. *New Phytologist* 203, 245-256.
- Borcard, D., and Legendre, P. (2002). All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecological Modelling* 153, 51-68.
- Bowman, S., and Free, S. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28, 799-808.
- Brabcova, V., Novakova, M., Davidova, A., and 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.
- Brabcova, V., Stursova, M., and Baldrian, P. (2018). Nutrient content affects the turnover of fungal biomass in forest topsoil and the composition of associated microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 118, 187-198.
- Brown, M., and Chang, M. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology* 19, 1-7.
- Brundrett, M. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320, 37-77.
- Brundrett, M., and Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220, 1108-1115.
- Butler, M.J., and Day, A.W. (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 1115-1136.
- Cairney, J. (2012). Extramatrical mycelia of ectomycorrhizal fungi as moderators of carbon dynamics in forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* 47, 198-208.
- Canadell, J., Pitelka, L., and Ingram, J. (1996). The effects of elevated [CO₂] on plant-soil carbon below-ground: A summary and synthesis. *Plant and Soil* 187, 391-400.
- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W., Berg-Lyons, D., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Fierer, N., and Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4516-4522.
- Certano, A., Fernandez, C., Heckman, K., and Kennedy, P. (2018). The afterlife effects of fungal morphology: Contrasting decomposition rates between diffuse and rhizomorphic necromass. *Soil Biology & Biochemistry* 126, 76-81.
- Christias, C., Couvaraki, C., Georgopoulos, S.G., Macris, B., and Vomvoyanni, V. (1975). Protein-content and amino-acid composition of certain fungi evaluated for microbial protein production. *Applied Microbiology* 29, 250-254.
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le Quéré, C., Myneni, R. B., Piao, S., and Thornton, P.: Carbon and Other Biogeochem. Cy., in: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, edited by: Stocker, T. F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., and Midgley, P. M. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013.
- Clemmensen, K., Finlay, R., Dahlberg, A., Stenlid, J., Wardle, D., and Lindahl, B. (2015). Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long-term succession in boreal forests. *New Phytologist* 205, 1525-1536.

- Clemmensen, K.E., Bahr, A., Ovaskainen, O., Dahlberg, A., Ekblad, A., Wallander, H., Stenlid, J., Finlay, R.D., Wardle, D.A., and Lindahl, B.D. (2013). Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* 339, 1615-1618.
- Cohen, E. (2001). Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science* 57, 946-950.
- Coleman, D., Odum, E., and Crossley, D. (1992). Soil biology, soil ecology, and global change. *Biology and Fertility of Soils* 14, 104-111.
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Denef, K., and Paul, E. (2013). The microbial efficiency-matrix stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19, 988-995.
- Courty, P., Buee, M., Diedhiou, A., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M., Uroz, S., and Garbaye, J. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 679-698.
- Crowther, T., van den Hoogen, J., Wan, J., Mayes, M., Keiser, A., Mo, L., Averill, C., and Maynard, D. (2019). The global soil community and its influence on biogeochemistry. *Science* 365, 772.
- Crowther, T.W., Sokol, N.W., Oldfield, E.E., Maynard, D.S., Thomas, S.M., and Bradford, M.A. (2015). Environmental stress response limits microbial necromass contributions to soil organic carbon. *Soil Biology & Biochemistry* 85, 153-161.
- Curtis, P. (1996). A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant Cell and Environment* 19, 127-137.
- Davidson, E.A., and Janssens, I.A. (2006). Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440, 165-173.
- de Boer, W., Folman, L., Summerbell, R., and Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *Fems Microbiology Reviews* 29, 795-811.
- Del Rio, T., Abt, B., Spring, S., Lapidus, A., Nolan, M., Tice, H., Copeland, A., Cheng, J., Chen, F., Bruce, D., et al. (2010). Complete genome sequence of *Chitinophaga pinensis* type strain (UQM 2034^T). *Standards in Genomic Sciences* 2, 87-95.
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A., Brewer, T., Benavent-Gonzalez, A., Eldridge, D., Bardgett, R., Maestre, F., Singh, B., and Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 359, 320.
- Driver, J., Holben, W., and Rillig, M. (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 101-106.
- Edgar, R. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.
- Edgar, R. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10, 996.
- Eisenman, H., and Casadevall, A. (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 931-940.
- Ekblad, A., Wallander, H., Godbold, D.L., Cruz, C., Johnson, D., Baldrian, P., Bjork, R.G., Epron, D., Kieliszewska-Rokicka, B., Kjoller, R., et al. (2013). The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling. *Plant and Soil* 366, 1-27.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1989). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter

- Feofilova, E. (2010). The fungal cell wall: Modern concepts of its composition and biological function. *Microbiology* 79, 711-720.
- Fernandez, C., Heckman, K., Kolka, R., and Kennedy, P. (2019). Melanin mitigates the accelerated decay of mycorrhizal necromass with peatland warming. *Ecology Letters* 22, 498-505.
- Fernandez, C., and Kennedy, P. (2018). Melanization of mycorrhizal fungal necromass structures microbial decomposer communities. *Journal of Ecology* 106, 468-479.
- Fernandez, C., and Koide, R. (2012). The role of chitin in the decomposition of ectomycorrhizal fungal litter. *Ecology* 93, 24-28.
- Fernandez, C., and Koide, R. (2014). Initial melanin and nitrogen concentrations control the decomposition of ectomycorrhizal fungal litter. *Soil Biology & Biochemistry* 77, 150-157.
- Fernandez, C., Langley, J., Chapman, S., McCormack, M., and Koide, R. (2016). The decomposition of ectomycorrhizal fungal necromass. *Soil Biology & Biochemistry* 93, 38-49.
- Fernandez, C., McCormack, M., Hill, J., Pritchard, S., and Koide, R. (2013). On the persistence of *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizas and its implications for forest carbon and nutrient cycles. *Soil Biology & Biochemistry* 65, 141-143.
- Fernandez, C.W., and Koide, R.T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology* 6, 479-486.
- Fierer, N., Bradford, M., and Jackson, R. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354-1364.
- Fierer, N., Craine, J.M., McLaughlan, K., and Schimel, J.P. (2005). Litter quality and the temperature sensitivity of decomposition. *Ecology* 86, 320-326.
- Fontaine, S., Henault, C., Amor, A., Bdioui, N., Bloor, J., Maire, V., Mary, B., Revalliot, S., and Maron, P. (2011). Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 86-96.
- Gadgil, R.L., and Gadgil, P.D. (1971). Mycorrhiza and litter decomposition. *Nature* 233, 133.
- Gadkar, V., and Rillig, M. (2006). The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *Fems Microbiology Letters* 263, 93-101.
- Gartner, T.B., and Cardon, Z.G. (2004). Decomposition dynamics in mixed-species leaf litter. *Oikos* 104, 230-246.
- Godbold, D.L., Hoosbeek, M.R., Lukac, M., Cotrufo, M.F., Janssens, I.A., Ceulemans, R., Polle, A., Velthorst, E.J., Scarascia-Mugnozza, G., De Angelis, P., et al. (2006). Mycorrhizal hyphal turnover as a dominant process for carbon input into soil organic matter. *Plant and Soil* 281, 15-24.
- Gray, T.R.G., and Baxby, P. (1968). Chitin decomposition in soil .2. Ecology of chitinoclastic micro-organisms in forest soil. *Transactions of the British Mycological Society* 51, 293.
- Guenet, B., Camino-Serrano, M., Ciais, P., Tifafi, M., Maignan, F., Soong, J., and Janssens, I. (2018). Impact of priming on global soil carbon stocks. *Global Change Biology* 24, 1873-1883.
- Hagenbo, A., Kyaschenko, J., Clemmensen, K., Lindahl, B., and Fransson, P. (2018). Fungal community shifts underpin declining mycelial production and turnover across a *Pinus sylvestris* chronosequence. *Journal of Ecology* 106, 490-501.
- Hirose, D., Matsuoka, S., and Osono, T. (2013). Assessment of the fungal diversity and succession of ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis. *Mycologia* 105, 837-843.
- Hobbie, E.A. (2006). Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* 87, 563-569.

- Hobbie, J.E., and Hobbie, E.A. (2006). N-15 in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology* 87, 816-822.
- Ihrmark, K., Bodeker, I., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandstrom-Durling, M., Clemmensen, K., et al. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *Fems Microbiology Ecology* 82, 666-677.
- Isaac, S., and Nair, M. (2005). Biodegradation of leaf litter in the warm humid tropics of Kerala, India. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1656-1664.
- Janssen, P. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1719-1728.
- Jumpponen, A., and Trappe, J. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140, 295-310.
- Keeling, C., Bacastow, R., Bainbridge, A., Ekdahl, C., Guenther, P., Waterman, L., and Chin, J. (1976) Atmospheric carbon dioxide variations at Mauna Loa Observatory, Hawaii. *Tellus* 28, 538-551.
- Kejzar, A., Gobec, S., Plemenitas, A., and Lenassi, M. (2013). Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology* 117, 368-379.
- Keller, N.P., Turner, G., and Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 937-947.
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A.A., Galinski, E.A., and Gunde-Cimerman, N. (2007). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology-Sgm* 153, 4261-4273.
- Kogel-Knabner, I. (2002). The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 139-162.
- Kohout P. (2017) Biogeography of Ericoid Mycorrhiza. In: Tedersoo L. (eds) Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), 230. Springer, Cham
- Kohout, P., Charvatova, M., Stursova, M., Masinova, T., Tomsovsy, M., and Baldrian, P. (2018). Clearcutting alters decomposition processes and initiates complex restructuring of fungal communities in soil and tree roots. *Isme Journal* 12, 692-703.
- Koide, R., and Malcolm, G. (2009). N concentration controls decomposition rates of different strains of ectomycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 2, 197-202.
- Koide, R.T., Fernandez, C.W., and Peoples, M.S. (2011). Can ectomycorrhizal colonization of *Pinus resinosa* roots affect their decomposition? *New Phytologist* 191, 508-514.
- Koide, R.T., and Wu, T. (2003). Ectomycorrhizas and retarded decomposition in a *Pinus resinosa* plantation. *New Phytologist* 158, 401-407.
- Kunito, T., Tobitani, T., Moro, H., and Toda, H. (2012). Phosphorus limitation in microorganisms leads to high phosphomonoesterase activity in acid forest soils. *Pedobiologia* 55, 263-270.
- Kuzyakov, Y. (2002). Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 382-396.
- Kuzyakov, Y. (2010). Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 1363-1371.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J., and Stahr, K. (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1485-1498.
- Kyanko, M.V., Canel, R.S., Ludemann, V., Pose, G., and Wagner, J.R. (2013). β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology* 49, 41-45.

- Lal, R. (2004). Soil carbon sequestration to mitigate climate change. *Geoderma* 123, 1-22.
- Lamour, A., Termorshuizen, A., Volker, D., and Jeger, M. (2007). Network formation by rhizomorphs of *Armillaria lutea* in natural soil: their description and ecological significance. *Fems Microbiology Ecology* 62, 222-232.
- Lauber, C., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5111-5120.
- Lesage, G., and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 317.
- Lindahl, B., and Tunlid, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi - potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist* 205, 1443-1447.
- Lopez-Mondejar, R., Brabcova, V., Stursova, M., Davidova, A., Jansa, J., Cajthaml, T., and 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.
- Lopez-Mondejar, R., Zuhlke, D., Becher, D., Riedel, K., and Baldrian, P. (2016). Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports* 6.
- Maillard, F., Schilling, J., Andrews, E., Schreiner, K., and Kennedy, P. (2020). Functional convergence in the decomposition of fungal necromass in soil and wood. *Fems Microbiology Ecology* 96.
- Malard, L., and Pearce, D. (2018). Microbial diversity and biogeography in Arctic soils. *Environmental Microbiology Reports* 10, 611-625.
- Malik, K., and Haider, K. (1982). Decomposition of C-14-labeled melanoid fungal residues in a marginally sodic soil. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 457-460.
- Marx, D., and Davey, C. (1969). Influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on resistance of pine roots to pathogenic infections .3. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 59, 549.
- McCormack, M.L., Pritchard, S.G., Breland, S., Davis, M.A., Prior, S.A., Runion, G.B., Mitchell, R.J., and Rogers, H.H. (2010). Soil fungi respond more strongly than fine roots to elevated CO₂ in a model regenerating longleaf pine-wiregrass ecosystem. *Ecosystems* 13, 901-916.
- McKee, L., and Brumer, H. (2015). Growth of *Chitinophaga pinensis* on plant cell wall glycans and characterisation of a glycoside hydrolase family 27 β -L-Arabinopyranosidase implicated in arabinogalactan utilisation. *Plos One* 10.
- Meehl, G., Washington, W., Santer, B., Collins, W., Arblaster, J., Hu, A., Lawrence, D., Teng, H., Buja, L., and Strand, W. (2006). Climate change projections for the twenty-first century and climate change commitment in the CCSM3. *Journal of Climate* 19, 2597-2616.
- Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *European Journal of Cell Biology* 90, 759-769.
- Nagy, N.E., and Fossdal, C.G. (2013). Host responses in Norway spruce roots induced to the pathogen *Ceratocystis polonica* are evaded or suppressed by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Plant Biology* 15, 99-110.
- Nannipieri, P., and Eldor, P. (2009). The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 2357-2369.
- Napoli, C., Mello, A., Borra, A., Vizzini, A., Sourzat, P., and Bonfante, P. (2010). *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist* 185, 237-247.

- Neufeld, J., and Mohn, W. (2005). Unexpectedly high bacterial diversity in arctic tundra relative to boreal forest soils, revealed by serial analysis of ribosomal sequence tags. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5710-5718.
- Nguyen, N., Song, Z., Bates, S., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J., and Kennedy, P. (2016). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* 20, 241-248.
- Norby, R., DeLucia, E., Gielen, B., Calfapietra, C., Giardina, C., King, J., Ledford, J., McCarthy, H., Moore, D., Ceulemans, R., et al. (2005). Forest response to elevated CO₂ is conserved across a broad range of productivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18052-18056.
- Oechel, W., Laskowski, C., Burba, G., Gioli, B., and Kalhori, A. (2014). Annual patterns and budget of CO₂ flux in an Arctic tussock tundra ecosystem. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* 119, 323-339.
- Oreskes, N. (2004). Beyond the ivory tower - The scientific consensus on climate change. *Science* 306, 1686-1686.
- Orwin, K.H., Kirschbaum, M.U.F., St John, M.G., and Dickie, I.A. (2011). Organic nutrient uptake by mycorrhizal fungi enhances ecosystem carbon storage: a model-based assessment. *Ecology Letters* 14, 493-502.
- Osono, T. (2007). Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research* 22, 955-974.
- Osono, T., and Takeda, H. (1999). Decomposing ability of interior and surface fungal colonizers of beech leaves with reference to lignin decomposition. *European Journal of Soil Biology* 35, 51-56.
- Pang, P., and Kolenko, H. (1986). Phosphomonoesterase activity in forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 18, 35-39.
- Perveen, N., Barot, S., Maire, V., Cotrufo, M., Shahzad, T., Blagodatskaya, E., Stewart, C., Ding, W., Siddiq, M., Dimassi, B., et al. (2019). Universality of priming effect: An analysis using thirty five soils with contrasted properties sampled from five continents. *Soil Biology & Biochemistry* 134, 162-171.
- Piao, S., Sitch, S., Ciais, P., Friedlingstein, P., Peylin, P., Wang, X., Ahlstrom, A., Anav, A., Canadell, J., Cong, N., et al. (2013). Evaluation of terrestrial carbon cycle models for their response to climate variability and to CO₂ trends. *Global Change Biology* 19, 2117-2132.
- Pickles, B.J., Genney, D.R., Potts, J.M., Lennon, J.J., Anderson, I.C., and Alexander, I.J. (2010). Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* 186, 755-768.
- Plattner, G., Knutti, R., Joos, F., Stocker, T., von Bloh, W., Brovkin, V., Cameron, D., Driesschaert, E., Dutkiewicz, S., Eby, M., et al. (2008). Long-term climate commitments projected with climate-carbon cycle models. *Journal of Climate* 21, 2721-2751.
- Purin, S., and Rillig, M. (2008). Immuno-cytolocalization of glomalin in the mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 1000-1003.
- Rasanayagam, S., and Jeffries, P. (1992). Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 96, 971-976.
- Read, D. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47, 376-391.
- Read, D., Leake, J., and Perez-Moreno, J. (2004). Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 82, 1243-1263.
- Reynolds, H., and Barton, H. (2014). Comparison of the white-nose syndrome agent *Pseudogymnoascus destructans* to cave-dwelling relatives suggests reduced saprotrophic enzyme activity. *Plos One* 9.

- Rice, A., and Currah, R. (2006). Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*. *Mycologia* 98, 307-318.
- Riley, P. (1997). Melanin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 1235-1239.
- Rillig, M.C., Caldwell, B.A., Wosten, H.A.B., and Sollins, P. (2007). Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry* 85, 25-44.
- Rineau, F., Roth, D., Shah, F., Smits, M., Johansson, T., Canback, B., Olsen, P., Persson, P., Grell, M., Lindquist, E., et al. (2012). The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. *Environmental Microbiology* 14, 1477-1487.
- Robl, D., Delabona, P., Mergel, C., Rojas, J., Costa, P., Pimentel, I., Vicente, V., Pradella, J., and Padilla, G. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *Bmc Biotechnology* 13.
- Rosas, A.L., and Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *Fems Microbiology Letters* 153, 265-272.
- Russell, A.E. (2014). Unexpected effects of chitin, cellulose, and lignin addition on soil dynamics in a wet tropical Forest. *Ecosystems* 17, 918-930.
- Ryan, M., Schreiner, K., Swenson, J., Gagne, J., and Kennedy, P. (2020). Rapid changes in the chemical composition of degrading ectomycorrhizal fungal necromass. *Fungal Ecology* 45.
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., and Kopecky, J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2902-2907.
- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Vallorani, L., Zambonelli, A., Citterio, B., Malatesta, M., and Stocchi, V. (1998). Biochemical and morphological modifications during the growth of *Tuber borchii* mycelium. *Mycological Research* 102, 403-409.
- Sangkhobol, V., and Skerman, V. (1981). *Chitinophaga*, a new genus of chitinolytic myxobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31, 285-293.
- Scheller, H., Ulvskov, P., Merchant, S., Briggs, W., and Ort, D. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.
- Schlesinger, W., and Andrews, J. (2000). Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 48, 7-20.
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Koegel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., et al. (2011). Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49-56.
- Schostag, M., Stibal, M., Jacobsen, C., Baelum, J., Tas, N., Elberling, B., Jansson, J., Semenchuk, P., and Prieme, A. (2015). Distinct summer and winter bacterial communities in the active layer of Svalbard permafrost revealed by DNA- and RNA-based analyses. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Schweigert, M., Herrmann, S., Miltner, A., Fester, T., and Kaestner, M. (2015). Fate of ectomycorrhizal fungal biomass in a soil bioreactor system and its contribution to soil organic matter formation. *Soil Biology & Biochemistry* 88, 120-127.
- Selosse, M., Setaro, S., Glatard, F., Richard, F., Urcelay, C., and Weiss, M. (2007). *Sebaciniales* are common mycorrhizal associates of *Ericaceae*. *New Phytologist* 174, 864-878.
- Serreze, M., Walsh, J., Chapin, F., Osterkamp, T., Dyurgerov, M., Romanovsky, V., Oechel, W., Morison, J., Zhang, T., and Barry, R. (2000). Observational evidence of recent change in the northern high-latitude environment. *Climatic Change* 46, 159-207.

- Shaver, G., Giblin, A., Nadelhoffer, K., Thieler, K., Downs, M., Laundre, J., and Rastetter, E. (2006). Carbon turnover in Alaskan tundra soils: effects of organic matter quality, temperature, moisture and fertilizer. *Journal of Ecology* 94, 740-753.
- Simpson, A., Simpson, M., Smith, E., and Kelleher, B. (2007). Microbially derived inputs to soil organic matter: Are current estimates too low? *Environmental Science & Technology* 41, 8070-8076.
- Sistla, S., Asao, S., and Schimel, J. (2012). Detecting microbial N-limitation in tussock tundra soil: Implications for Arctic soil organic carbon cycling. *Soil Biology & Biochemistry* 55, 78-84.
- Sistla, S., Moore, J., Simpson, R., Gough, L., Shaver, G., and Schimel, J. (2013). Long-term warming restructures Arctic tundra without changing net soil carbon storage. *Nature* 497, 615.
- Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Ruthes, A.C., Czelusniak, P.A., Santana-Filho, A.P., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., and Iacomini, M. (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers* 87, 368-376.
- Snajdr, J., Cajthaml, T., Valaskova, V., Merhautova, V., Petrankova, M., Spetz, P., Leppanen, K., and 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.
- Strickland, M.S., Lauber, C., Fierer, N., and Bradford, M.A. (2009). Testing the functional significance of microbial community composition. *Ecology* 90, 441-451.
- Strullu-Derrien, C., Selosse, M., Kenrick, P., and Martin, F. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist* 220, 1012-1030.
- Swift MJ, Heal OW, Anderson JM (1979) Decomposition in terrestrial ecosystems. In: Anderson DJ, Greig-smith P, Pitelka FA (eds) *Studies in ecology*, vol 5. University of California Press, Berkeley, 167-219.
- Talamantes, D., Biabini, N., Dang, H., Abdoun, K., and Berlemont, R. (2016). Natural diversity of cellulases, xylanases, and chitinases in bacteria. *Biotechnology For Biofuels* 9.
- Tape, K., Hallinger, M., Welker, J., and Ruess, R. (2012). Landscape heterogeneity of shrub expansion in Arctic Alaska. *Ecosystems* 15, 711-724.
- Taylor AFS, Alexander IJ. (2005) The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19, 102-112.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Polme, S., Koljalg, U., Yorou, N., Wijesundera, R., Ruiz, L., Vasco-Palacios, A., Thu, P., Suija, A., et al. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1078.
- Tomasik, P., and Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol 68 68, 59-436.
- Treseder, K.K., and Allen, M.F. (2000). Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. *New Phytologist* 147, 189-200.
- Treseder, K.K., Allen, M.F., Ruess, R.W., Pregitzer, K.S., and Hendrick, R.L. (2005). Lifespans of fungal rhizomorphs under nitrogen fertilization in a pinyon-juniper woodland. *Plant and Soil* 270, 249-255.
- Treseder, K.K., and Lennonb, J.T. (2015). Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79, 243-262.
- Trofymow, J.A., Morley, C.R., Coleman, D.C., and Anderson, R.V. (1983). Mineralization of cellulose in the presence of chitin and assemblages of microflora and fauna in soil. *Oecologia* 60, 103-110.

- Tveit, A., Schwacke, R., Svenning, M., and Urich, T. (2013). Organic carbon transformations in high-Arctic peat soils: key functions and microorganisms. *Isme Journal* 7, 299-311.
- Vargas, R., and Allen, M. (2008). Dynamics of fine root, fungal rhizomorphs, and soil respiration in a mixed temperate forest: Integrating sensors and observations. *Vadose Zone Journal* 7, 1055-1064.
- Vetrovsky, T., Baldrian, P., and Morais, D. (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics* 34, 2292-2294.
- Vetrovsky, T., Kohout, P., Kopecky, M., Machac, A., Man, M., Bahnmann, B., Brabcova, V., Choi, J., Meszarosova, L., Human, Z., et al. (2019). A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nature Communications* 10.
- Walker, M., Wahren, C., Hollister, R., Henry, G., Ahlquist, L., Alatalo, J., Bret-Harte, M., Calef, M., Callaghan, T., Carroll, A., et al. (2006). Plant community responses to experimental warming across the tundra biome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1342-1346.
- Wallenstein, M., McMahon, S., and Schimel, J. (2007). Bacterial and fungal community structure in Arctic tundra tussock and shrub soils. *Fems Microbiology Ecology* 59, 428-435.
- Wang, B., and Qiu, Y. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299-363.
- Wang, S., Lin, B., Liang, T., Wang, C., Wu, P., and Liu, J. (2010). Purification and characterization of chitinase from a new species strain, *Pseudomonas* sp. TKU008. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 1001-1005.
- Wang, X., Piao, S., Ciais, P., Friedlingstein, P., Myneni, R., Cox, P., Heimann, M., Miller, J., Peng, S., Wang, T., et al. (2014). A two-fold increase of carbon cycle sensitivity to tropical temperature variations. *Nature* 506, 212.
- Wang, Y.L., and Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3864-3866.
- Warmink, J., Nazir, R., and van Elsas, J. (2009). Universal and species-specific bacterial “fungiphiles” in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology* 11, 300-312.
- Wolfe, B., Tulloss, R., and Pringle, A. (2012). The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. *Plos One* 7.
- Wolfe, E., and Ballhorn, D. (2020). Do Foliar Endophytes Matter in Litter Decomposition? *Microorganisms* 8.
- Wosten, H. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* 55, 625-646.
- Wosten, H.A.B., and de Vocht, M.L. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 1469, 79-86.
- Wu, Q., Cao, M., Zou, Y., and He, X. (2014a). Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae, and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliolate orange. *Scientific Reports* 4.
- Wu, Z., McGrouther, K., Huang, J., Wu, P., Wu, W., and Wang, H. (2014b). Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: Field experiment. *Soil Biology & Biochemistry* 68, 283-290.
- Yuan, Z., and Chen, L. (2014). The role of endophytic fungal individuals and communities in the decomposition of *Pinus massoniana* needle litter. *Plos One* 9.
- Zak, D., Pregitzer, K., Curtis, P., Teeri, J., Fogel, R., and Randlett, D. (1993). Elevated atmospheric CO₂ and feedback between carbon and nitrogen cycles. *Plant and Soil* 151, 105-117.

Zhang, T., Wang, N., Liu, H., Zhang, Y., and Yu, L. (2016). Soil pH is a key determinant of soil fungal community composition in the Ny-Alesund Region, Svalbard (High Arctic). *Frontiers in Microbiology* 7.

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., and Xu, J. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *Bmc Genomics* 14

