

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Botanika



**Bc. Václav Šťovíček**

Severní Čechy jako potenciální oblast výskytu zástupců rodu *Tuber* včetně lanýže letního  
(*Tuber aestivum*)

Northern Bohemia as a potential distribution area of the genus *Tuber* including summer  
truffles (*Tuber aestivum*)

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Milan Gryndler, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 30. 4. 2015

Podpis

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Milanu Gryndlerovi, CSc. (Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha) za vedení této práce, všestrannou pomoc a důležité připomínky a v neposlední řadě za trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu laboratoře Ekologie hub v Mikrobiologickém ústavu za pomoc při práci v laboratoři a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Práce byla vykonána v MBÚ AVČR Praha s finanční podporou grantu GAČR P504/10/0382.

V neposlední řadě bych chtěl také poděkovat své rodině, zejména rodičům, za velkou podporu a vhodné zázemí, které mi od nich bylo poskytnuto po celou dobu mého studia.

## ABSTRAKT

Lanýže patří k ekonomicky významným houbám, které se přirozeně vyskytují na území České republiky. O jejich geografické distribuci existují doklady založené na terénním výskytu plodnic. Moderní detekční metody nám však dovolují zjistit výskyt druhů lanýžů, aniž by musely být nalézány jejich podzemní plodnice. V této práci byla použita molekulárně genetická detekční metoda využívající polymerázovou řetězovou reakci se specifickými primery, na jejímž základě lze zjistit, zda se ve studovaných vzorcích vyskytují zástupci rodu *Tuber* včetně druhu *Tuber aestivum*. Zástupci rodu *Tuber* byli tímto způsobem zjištěni v 67 případech z celkového počtu 190 vzorků. Šlo s velkou pravděpodobností o druhy *Tuber borchii*, *Tuber foetidum*, *Tuber rufum*, *Tuber dryophilum*, *Tuber umbilicatum*, *Tuber huidongense*, *Tuber oligospermum* a *Tuber aestivum*. Protože podobnost sekvencí s nejpodobnějším druhem je v některých případech poměrně nízká, mohlo by se v těchto případech jednat o dosud neznámé druhy lanýžů. Faktory prostředí, které byly analyzovány, vysvětlily pouze malou část variability, působily velmi slabě a nelze konstatovat, že by některý z nich byl určující pro výskyt či absenci druhu ve vzorku. Bylo zjištěno, že se lanýže na studovaném území nevyhýbají půdám svahů, kde se jejich výskyt jeví dokonce častější než na lokalitách mimo svah. Toto zjištění ukazuje možnost využití svahů k případnému pěstování lanýžů, pokud bude umožněno legislativou.

**Klíčová slova:** Rod *Tuber*, *Tuber aestivum*, detekce, severní Čechy, faktory prostředí.

## ABSTRACT

Truffles are economically important fungi that are naturally present in the territory of the Czech Republic. Their geographical distribution is traditionally documented by the field incidence of fruitbodies. Advanced detection methods, however, enabled us to detect the presence of *Tuber* spp. at localities without a need for finding the underground fruitbodies. In this work, a molecular genetic detection method based on the polymerase chain reaction with specific primers was used. It enables us to determine the occurrence of members of the genus *Tuber* including *Tuber aestivum* in the studied samples. Members of the genus *Tuber* were detected in 67 cases out of a total of 190 samples. Highly probably, *Tuber borchii*, *Tuber foetidum*, *Tuber rufum*, *Tuber dryophilum*, *Tuber umbilicatum*, *Tuber huidongense*, *Tuber oligospermum* and *Tuber aestivum* have been detected. Since the sequence similarity with the closest species is relatively low in some cases, some of the obtained sequences might belong to hitherto unknown truffle species. Environmental factors analyzed explain only a small portion of the variability, acted weakly and cannot be taken as decisive for the presence or the absence of a species in a sample. The occurrence of truffles in the slopes of the study area was noted and it seems to be still more common there than at locations outside the slope. This finding is important because it shows the possibility of using the slopes for the cultivation of truffles in future, if the cultivation will be enabled by the legislation.

**Key words:** Genus *Tuber*, *Tuber aestivum*, detection, northern Bohemia, environmental factors.

# OBSAH

<b>PŘEDMLUVA</b>	7
<b>ÚVOD</b>	8
<b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	10
1.1 Rod <i>Tuber</i> : zařazení do systému	10
1.1.1 Ektomykorhizní symbióza	10
1.1.2 Dějiny lanýžů v Evropě	11
1.1.3 Dějiny lanýžů na našem území	12
1.1.4 Pěstování lanýžů ve světě	13
1.1.5 Pěstování lanýžů na našem území	14
1.1.6 Zajímavosti týkající se zástupců rodu <i>Tuber</i>	15
1.2 Charakteristika druhu <i>Tuber aestivum</i>	16
1.2.1 Vlastnosti <i>Tuber aestivum</i>	17
1.2.2 Morfologické znaky	17
1.2.3 Výskyt <i>Tuber aestivum</i> na našem území	19
1.3 Charakteristika vybraných oblastí severních Čech	20
1.3.1 Klimatická charakteristika	20
1.3.2 Pedologická charakteristika	20
1.3.3 Typy vegetace ve vybraných oblastech	21
<b>2. PRAKTICKÁ ČÁST</b>	24
2.1 Úvod	24
2.2 Materiál a metody	24
2.2.1 Odběr a uchování vzorků	25
2.2.2 Přehled odebraných vzorků	27
2.2.3 Zpracování odebraných vzorků	34
2.2.3.1 Stanovení pH výluhu půdních vzorků	34
2.2.3.2 Stanovení vodivosti	34
2.2.3.3 Stanovení obsahu rozpustného vápníku v půdě	35
2.2.3.4 Stanovení trofického potenciálu půdních vzorků	35
2.2.3.5 Extrakce DNA z kořenů	36
2.2.3.6 Spektrofotometrické měření DNA	40
2.2.4 Metoda detekující zástupce rodu <i>Tuber</i>	40
2.2.4.1 Příprava reakční směsi PCR I	40

2.2.4.2	Program termocykléru pro PCR I	41
2.2.4.3	Elektroforetické ověření PCR I	41
2.2.4.4	Příprava reakční směsi PCR II	42
2.2.4.5	Program termocykléru pro PCR II	43
2.2.4.6	Elektroforetické ověření PCR II	43
2.2.5	Metoda detekující druh <i>Tuber aestivum</i>	44
2.2.5.1	Příprava reakční směsi PCR I	44
2.2.5.2	Program termocykléru pro PCR I	45
2.2.5.3	Elektroforetické ověření PCR I	45
2.2.5.4	Příprava reakční směsi PCR II	45
2.2.5.5	Program termocykléru pro PCR II	46
2.2.5.6	Elektroforetické ověření PCR II	46
2.2.6	Druhovú identifikace	47
2.2.7	Analýza dat	47
2.3	Výsledky	48
2.3.1	pH, vodivost, obsah rozpustného vápníku půdních vzorků	48
2.3.2	Spektrofotometrické měření DNA	51
2.3.3	Trofický potenciál půdních vzorků	55
2.3.4	Elektroforetické ověření PCR I	57
2.3.5	Elektroforetické ověření PCR II - detekce zástupců rodu <i>Tuber</i>	58
2.3.6	Elektroforetické ověření PCR II - detekce druhu <i>Tuber aestivum</i>	61
2.3.7	Druhovú identifikace	62
2.3.8	Faktory prostředí určující výskyt zástupců rodu <i>Tuber</i>	68
2.3.9	Výskyt lanýžů v půdách svahů	74
2.4	Popis vybraných druhů identifikovaných jako nejpodobnější s nositeli mnou získaných sekvencí genu pro beta tubulin	75
	<b>DISKUSE</b>	78
	<b>ZÁVĚR</b>	81
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	82
	<b>ELEKTRONICKÉ ZDROJE</b>	86
	<b>PŘÍLOHY</b>	87

## PŘEDMLUVA

Téma své diplomové práce jsem si zvolil proto, abych zjistil, jaké druhy lanýžů lze v zájmovém území (přesněji v severozápadní části České křídové pánve v Severočeském kraji, v okolí Teplic, Lovosic, Litoměřic, Libochovic, Roudnice nad Labem, Loun, Žatce, Chomutova a Mostu) detekovat doporučenými metodickými prostředky, jaká je frekvence detekce lanýžů těmito prostředky, zda je přítomen lanýž letní (*Tuber aestivum*) v oblastech s intenzivním zemědělským využitím, zda jsou lanýže přítomny v půdách svahů a také jsem se snažil postihnout faktory prostředí, které by mohly být důležité nebo určující pro výskyt lanýžů (pH půdy, koncentrace vápníku, trofický potenciál půdy, vodivost půdního výluhu jako indikátor salinity, nadmořská výška lokality, výskyt potenciálních hostitelských rostlin a charakter podrostu).

Cílem první části diplomové práce je shrnout poznatky o rodu *Tuber* a o druhu *Tuber aestivum*. V literárním přehledu je uvedeno zařazení rodu *Tuber* v systému hub, a je zmíněn vývoj znalostí o lanýžích v Evropě a na našem území od dávných dob až do současnosti. Je popsáno pěstování lanýžů u nás i ve světě a charakteristika ektomykorhizní symbiózy, kterou lanýž tvoří s hostitelskou rostlinou i charakteristika vybraných oblastí severních Čech. V případě druhu *Tuber aestivum* jsem se zaměřil na jeho vlastnosti, morfologické znaky a výskyt na našem území.

Cílem druhé, praktické části, byla aplikace molekulárně genetické metody detekce zástupců rodu *Tuber* včetně lanýže letního (*Tuber aestivum*). Provedl jsem odběr půdních vzorků s ektomykorhizami ve vybraných oblastech severních Čech, extrakci DNA z ektomykorhiz, kvalitativní detekci zástupců rodu *Tuber* včetně *Tuber aestivum* pomocí PCR se specifickými primery i druhovou identifikaci porovnáním sekvencí pomocí genetické databáze GenBank a mnohorozměrnou analýzu vybraných půdních parametrů a faktorů prostředí pomocí programu Canoco.

## ÚVOD

Rod *Tuber* patří mezi *Ascomycota* (houby vřeckovýtrusé). Rostou ve vápenitých půdách v ektomykorhizním spojení s poměrně širokou škálou listnatých dřevin, včetně dubu (*Quercus* spp.), lísky (*Corylus* spp.), topolu (*Populus* spp.), buku (*Fagus* spp.), cistu (*Cistus* spp.), habru (*Carpinus betulus*) a lípy (*Tilia* spp.) (Ceruti et al., 2003) a vzácně i pod jehličnany, především borovicemi (*Pinus*.) (Skála, 2001).

Vytváří hypogeický askokarp (plodnici) známý jako lanýž, který může částečně vyčnívat nad povrch půdy. Plodnice se zakládá pod zemí v hloubce od 1 do 30 cm (Streiblová et al., 2012). Zralé plodnice mají velmi intenzivní vůni, která proniká půdou. Vůně láká některé druhy vysoké a černé zvěře i drobné hlodavce, kteří plodnice vyhrabávají a konzumují. Zralé výtrusy (askospory), které se tvoří v plodnicích, procházejí bez poškození zažívacím traktem zvířat, což zajišťuje šíření houby do nových lokalit (Gryndler et al., 2004; Streiblová et al., 2012). Jde o specifický mechanismus, který se vyvinul během evoluce a slouží k zachování a šíření tohoto druhu v přírodě.

V současné době se vyhledávání lanýžů při sběru v terénu provádí hlavně pomocí vycvičených psů, nebo mladého prasete (Gryndler et al., 2004). Na lanýže je také vázána tzv. lanýžová muška (*Suillia pallida*), která rovněž slouží k lokalizaci lanýžů (Kalina et Váňa, 2006). Látkou, která se uvolňuje ze zrajících plodnic a která neomylně tato zvířata k plodnici přivede, je velmi pravděpodobně dimetylsulfid (Gryndler et al., 2004; Splivallo et al., 2012).

Nejznámějšími druhy rodu *Tuber* jsou, lanýž černovýtrusý (*Tuber melanosporum* Vittad.) a lanýž bílý (*Tuber magnatum* Pico). Plodnice těchto druhů mají nezaměnitelné výrazné aroma, které je klíčem k jejich světové gastronomické proslulosti. Díky tomu se tyto dva druhy staly společně s kaviárem nejdražšími kulinářskými lahůdkami na světových trzích (Streiblová et al., 2012).

Geografické rozložení výskytu známých zástupců rodu *Tuber* se týká hlavně mírného pásu severní polokoule (Pomarico et al., 2007). Zástupci rodu *Tuber* se přirozeně vyskytují ve třech odlišných oblastech: Evropa, jižní a východní Asie a Severní Amerika (Smith et Read, 2008). Zeměpisné rozložení výskytu zástupců rodu *Tuber* ukazuje podstatné rozdíly mezi jednotlivými druhy (Mello et al., 2006).

Za nejspolehlivější seznam všech známých druhů lanýžů považují Index Fungorum, na který se obraceli ve svých pracích Wang et al. (2007) a Zampieri et al. (2009).



Nalezneme zde seznam s celkem 191 druhy rodu *Tuber*. V Evropě je hlášeno celkem 27 druhů lanýžů (RiOUSset et al., 2001).

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Rod *Tuber*: zařazení do systému

Dříve se všechny druhy lanýžů řadily do řádu *Tuberales*, který dnes již není uznáván. V současné době rod *Tuber* řadíme do čeledi lanýžovitých (*Tuberaceae*):

Říše: *Fungi* Whittaker, 1959 – houby

Oddělení: *Ascomycota* Caval.-Sm. – houby vřeckovýtrusé

Podkmen: *Pezizomycotina* O.E. Erikss. & Winka

Třída: *Pezizomycetes* podtřída *Pezizomycetidae*

Řád: *Pezizales* – kustřebkotvaré

Čeleď: *Tuberaceae* – lanýžovité

Rod: *Tuber* P. Micheli ex F.H. Wigg. – lanýž

(<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id59709/>)

### 1.1.1 Ektomykorhizní symbióza

Jak už bylo zmíněno v úvodu, zástupci rodu *Tuber* tvoří ektomykorhizní symbiózu s širokou škálou listnatých dřevin, včetně jehličnanů, a proto byla do literárního přehledu zařazena kapitola s charakteristikou ektomykorhizní symbiózy.

Lesy mírného pásu a severské (boreální) ekosystémy, ale i tropické lesy tvoří z 95% symbiózu s ektomykorhizními houbami (Mello et al., 2002; Gryndler et al., 2004). Úspěch této symbiózy je většinou důsledkem výměny živin mezi rostlinou a houbou (Mello et al., 2002). Dostupnost živin v půdě, ovlivňuje kolonizaci ektomykorhizní houbou. Například v místech s nízkým obsahem P a K, je kolonizace upřednostňována (García-Montero et al., 2009). Houba poskytuje své hostitelské rostlině fosfor, stopové prvky, toleranci proti suchu, ochranu před patogeny a škůdci na oplátku za organický uhlík od svého hostitele (Pruett et al., 2008; Pruett et al., 2009). Vznik mykorhizní symbiózy je u ektomykorhizních hub podmínkou pro vytvoření plodnice a uzavření životního cyklu (Mello et al., 2002).

Klíčovým prvkem ektomykorhizní symbiózy jsou tzv. ektomykorhizy (ektomykorhizní kořínky). Jsou to přetvořené postranní kořínky dřevin a některých bylin,

keré pokrývá souvislý povlak hyf (hyfový plášť). Hyfy pronikají i do mezibuněčných prostorů kořenové kůry, kde tvoří tzv. Hartigovu síť (Holec et al., 2012). Ektomykorhizy jsou v půdním prostředí propojeny jednotlivými hyfami (periferní mycelium) nebo hyfovými svazky (Gryndler et al., 2004). Ty hrají klíčovou roli v regulaci přenosu živin mezi houbou a rostlinou a zvětšují půdní objem využitý rostlinou (Smith et Read, 2008). Ektomykorhizní houby také působí na půdní prostředí tím, že produkují řadu látek, které ovlivňují jiné organizmy ve svém okolí (Gryndler et al., 2004).

Ektomykorhizní symbióza vznikla nezávisle na sobě nejméně čtyřikrát (Smith et Read, 2008), a zřejmě měla zásadní význam při diverzifikaci (druhovém rozrůznění) jak hostitelských rostlin, tak i symbiotických hub. Ektomykorhizní symbióza je tedy vývojově nestabilní a zdá se, že nestabilita v čase je jednou z jejích hlavních charakteristických vlastností (Gryndler et al., 2004).

### **1.1.2 Dějiny lanýžů v Evropě**

Již před 4 000 lety byl lanýž poprvé zobrazen na sumerské desce v Mezopotámii. Ve čtvrtém století před naším letopočtem se poprvé zmiňuje o existenci lanýžů řecký Theophrastos z Eresu. Šlo o písemné doklady, které shrnovaly botanické poznatky klasické antiky. Zájem o lanýže poklesl v raném středověku, neboť si lidé mysleli, že jde o dílo ďábla. I přes svou špatnou pověst se ve vrcholném středověku stal lanýž černovýtrusý (*Tuber melanosporum*) součástí kuchařských receptů. Značný zájem o lanýže stoupl ve Francii v době renezanace a novověku. V současné době jsou lanýže vyhledávanou gastronomickou pochoutkou v mnoha zemích, a proto jejich popularita i cena stále stoupají (Streiblová et al., 2012).

V posledních desetiletích sběr lanýžů rostoucích volně (v tradičních přírodních podmínkách) výrazně poklesl v důsledku klimatických změn a nekompetentních lidských zásahů (Mello et al., 2006; Streiblová et al., 2010). Ani řízená produkce lanýžů nestačí pokrýt poptávku, která je asi 10x vyšší než stávající nabídka. V roce 2009 byly prodávány plodnice italského lanýže bílého (*T. magnatum*) za 200–300 euro/100g a v případě francouzského lanýže (*T. melanosporum*) se cena pohybovala kolem 210 eur/100g (Streiblová et al., 2012).

### 1.1.3 Dějiny lanýžů na našem území

V 50. letech 16. století byl vydán první ilustrovaný a latinsky psaný herbář *Commentarii in libros sex Pedacii Dioscoridis*, jehož autorem je P. A. Mattioli (1501–1577). Dílo shrnovalo přírodovědné poznatky uvedené doby. Následně bylo toto dílo vydáno v Praze v Českém jazyce pod názvem Herbář neboli Bylinář. V herbáři nalezneme první zmínku o dvou skupinách podzemních hub, které jsou pojmenovány jako „jelení hubky“ a „lenejšé“. Šlo zřejmě o lanýž ryšavý (*T. rufum* Pico) a lanýž letní (*T. aestivum* Vittad.). Tyto názvy byly spojovány s jelení zvěří, která pomocí čichu houby vyhledávala, a proto je české označení lanýž pravděpodobně odvozeno od slova laň (Streiblová et al., 2012).

Koncem 18. a začátkem 19. století se J. V. Krombholz (1782–1843) stal díky svému atlasu hub *Naturgetreue Abbildungen und Beschreibungen der essbaren, schädlichen und verdächtigen Schwämme* průkopníkem systematického studia hub. Dalším průkopníkem byl A. K. J. Corda (1809–1849) se svou klasickou šestisvazkovou publikací *Icones fungorum hucusque cognitorum* (1837–1854). Corda patří k zakladatelům mykologie jako vědy u nás i ve světě. Od dob jeho působení až dodnes je v naší zemi málo vědeckých publikací týkajících se lanýžů (Streiblová et al., 2012).

Od 20. let se můžeme setkat s poznatkami o lanýžích, které publikovaly v českých mykologických časopisech Klika (1927), Vacek (1948, 1949, 1950), Svrček (1958), Šebek (1985, 1987) a Skála (2001) (Streiblová et al., 2012).

Od devadesátých let až do nedávné minulosti nebyl v detailu rod *Tuber* u nás studován (Streiblová et al., 2010), takže zástupci nejsou zařazeni v červeném seznamu hub (makromycetů) České republiky (Holec et Beran, 2006).

Na našem území jsou zřejmě některé druhy lanýžů zastoupeny více, než jsme se původně domnívali. Potvrzují nám to práce od Zampieriho (2009) a Gryndlera (2011), založené na aplikaci molekulárně genetických metod, díky kterým jsme schopni detekovat DNA lanýžů v půdě a v kořenech potenciálních hostitelů bez nutnosti nálezu a sběru plodnic. Toto tvrzení potvrzují sběry provedené S. Valdou (2009), který se v posledních letech věnoval studiu našich lanýžů a uvádí z Čech 8 druhů (Streiblová et al., 2012).

### 1.1.4 Pěstování lanýžů ve světě

Již v 16. století lékař Bruyerin řekl, že je možné lanýže pěstovat. Ale až kolem roku 1810 Joseph Talon z Vacluse (jižní Francie) zjistil, že lanýže se vyskytují ve vápnité půdě zejména v blízkosti některých dubů (Gryndler et al., 2004; Mello et al., 2006), a proto vysadil žaludy, které pocházely z dubů rostoucích v blízkosti výskytu této houby do terénu. Asi po 8 až 10 letech nacházel na příslušných místech plodnice lanýže. Tento postup použil Auguste Rousseau a v roce 1848 vysadil ve Vacluse na 7 ha žaludy dubu, které byly infikované lanýžem a založil tím tradici francouzských lanýžáren (tzv. truffières) (Streiblová et al., 2012). Od té doby se pěstování lanýžů šířilo po Francii, Itálii, Německu a Španělsku do míst, kde byly vhodné klimatické podmínky a geologický podklad (vápenec) a postupně se vyvíjel a zdokonaloval způsob jejich pěstování (Gryndler et al., 2004).

Ke konci 19. století došlo k napadení francouzských vinic mšičkou révokaznou. Tato místa jsou vhodná pro lanýže, a proto se místo vinné révy vysazovaly doušky do půdy, která je ve Francii velice bohatá na spory lanýžů. Další neštěstí, které přispělo k rozvoji lanýžových plantáží, byl úhyn bource morušového. Na místech, kde rostly původně morušovníky, proběhla rozsáhlá výsadba mykORIZOVANÝCH doušek lanýžem. Díky tomu je počátek 20. století považován za zlatou éru produkce lanýže černovýtrusného (*T. melanosporum*) ve Francii (Streiblová et al., 2012). Roční produkce lanýže se zvýšila na 1588 tun (Mello et al., 2006).

Po konci druhé světové války se produkce lanýžů stále snižuje. Příčinou je zřejmě změna klimatických podmínek, vysazování jiných druhů dřevin v lesích, omezování ploch přirozeného výskytu lanýžů v přírodě, a také díky nedostatečnému obnovení starých plantáží. Díky těmto okolnostem poklesla na počátku 21. století ve Francii roční produkce lanýže černovýtrusného (*T. melanosporum*) na desítky tun (Pruett et al., 2009; Streiblová et al., 2012).

Proto v pozdních 70. letech 20. století začala Italská a Francouzská vláda podporovat výzkumné programy za účelem modernizace technologií, což by sebou přineslo zvýšení efektivity pěstování lanýžů (Mello et al., 2006; Streiblová et al., 2012).

Při komerční výrobě mykORIZOVANÝCH semenáčků se nejvíce používá *T. melanosporum* a v menší míře i *T. aestivum* a *T. borchii* (Bertini et al., 1999; Zambonelli et al., 2000; Gryndler et al., 2004). Ostatní jedlé lanýže o nízké kvalitě, jako jsou například *T. brumale*, *T. mesentericum*, *T. dryophilum* a *T. puberulum*, jsou považovány za plevelné,

pokud se vyskytnou v kulturách s cennějšími druhy (Bertini et al., 1999). Protože je velmi obtížné získat čisté kultury mycelia *Tuber* spp., tak se nejčastěji používá suspenze klíčících spor lanýže, díky které dojde k mykorizaci kořenového systému u semenáčků hostitelských rostlin (Iotti et al., 2002; Streiblová et al., 2012). Bohužel, tyto techniky často vedou k tomu, že je rostlina mykorizována špatným druhem lanýže, nebo jinou ektomykorhizní houbou jako je *Pulvinula constellatio* a *Sphaerosporella brunnea* (Iotti et al., 2002). Možnost mykorizace jiným druhem rodu *Tuber*, nebo jinou ektomykorhizní houbou dala impulz k rozvoji molekulárně genetických metod, díky nimž jsme schopni detekovat DNA lanýžů nebo jejich konkurentů v kořenech hostitelských rostlin (Smith et Read, 2008).

Po mykorizaci příslušným druhem lanýže se semenáčky hostitelských rostlin kultivují 2 až 3 roky a poté jsou nejlepší exempláře vysazovány do připraveného terénu (tzv. plantáží). Samotný sběr plodnic můžeme očekávat po 8 až 10 letech. Zakládání umělých plantáží s mykorizovanými semenáčky hostitelských rostlin je dnes jediný spolehlivý způsob produkce lanýžů ve větším měřítku (Streiblová et al., 2012). V důsledku toho se zakládání plantáží provádí i v netradičních oblastech, jako je například Izrael, Nový Zéland, Severní Amerika, Austrálie a Asie (Mello, 2006; Smith et Read, 2008; Streiblová et al., 2012).

### **1.1.5 Pěstování lanýžů na našem území**

Od 18. století se šlechtici snažili kultury lanýžů importovat na svá panství. Šlo o lanýže černovýtrusného (*T. melanosporum*), který byl dovezen z Francie (Streiblová et al., 2012). Například hrabě Herberstein v Žerotíně u Panenského Týnce pro svoji kuchyni nechával pěstovat *Tuber melanosporum* až do roku 1937 (Gryndler et al., 2004). V první polovině 19. století se také snažil pěstovat lanýže kníže Kinský na svém panství v Želevicích u Slaného a v Bakově u Slaného. O jaký druh šlo, však není známo (Houda, 1994; Streiblová et al., 2012). Plodnice *T. melanosporum* byla nalezena snad i v parku hraběte Schönborna v Dlažkovicích u Lovosic. Dalším místem, kde měla být kultura lanýže je park v Chocni (Gryndler et al., 2004).

Od roku 1913 proběhly pokusy s umělým pěstováním lanýžů na jižní a střední Moravě. Šlo o lokality, které byly známé výskytem lanýže letního (*T. aestivum*). Byly to lesy v oblasti Chřibských kopců, Karpatech, Lichtenštejnského panství v Moravském krasu, Dražanské vysočiny a Ždánickém lese. Jednalo se o první pokus řízené produkce

lanýžů ve střední Evropě. Vzniklo celkem 14 oplocených školek o rozloze 60 arů, u kterých proběhla postupná výsadba okolo 500 sazenic francouzských a tuzemských doubků mykORIZOVANÝCH lanýžem černoVýtrusným (*T. melanosporum*). V letech 1929 a 1941 byly kultury poškozeny tuhou zimou, kdy teplota klesala až k -40 až -45 °C, a také v důsledku nevyhovujících podmínek v průběhu dvou světových válek, takže tento experiment neposkytl důvěryhodné výsledky a pokusné školky postupem času splynuly s okolní vegetací (Gryndler et al., 2004; Streiblová et al., 2010; Streiblová et al., 2012).

### 1.1.6 Zajímavosti týkající se zástupců rodu *Tuber*

U *Tuber melanosporum*, *Tuber magantum* a *Tuber aestivum* byla studována řada chemických látek, zejména vyšších alifatických aldehydů a alkoholů, které vyvolávají svou přítomností nezaměnitelnou vůni i chuť. Hlavními vonnými látkami lanýžů jsou 2-butanon, 3-metylbutanal, metylbenzen, 2-butenal, hexanal, 2-metyl-2-butenal, heptanal, 3-metyl-1-butanol, 2-metyl-1-butanol, 2-heptenal, 2-oktenal, 1-okten-3-ol (tzv. houbový alkohol), kyselina octová, benzaldehyd, 2-etyl-1-hexanol, 2(3H)-dihydrofuranon, fenylacetaldehyd, fenyletanol a fenol (Gryndler et al., 2004).

Rod *Tuber* se vyznačuje také nízkým obsahem tuku a vysokým obsahem bílkovin. Důvodem, díky kterému je o lanýže tak velký zájem, je pravděpodobně to, že se v plodnicích a i ve fermentujícím myceliu lanýžů vyskytují celé řady chemických látek, jako jsou například steroly, ceramidy nebo fenolové látky. Všechny tyto látky podporují lidské zdraví, protože se podílejí na prevenci a léčbě mnoha chorob. Proto je možné pohlížet na lanýže, jako na potenciální zdroj látek podporujících lidské zdraví (Ana Villares et al., 2012; Tang et al., 2012).

U lanýže letního *Tuber aestivum*, ale i dalších lanýžů, byly nalezeny zdraví prospěšné rostlinné steroly (tj. brassicasterol, campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol a ergosterol) (Tang et al., 2012). Z nich například ergosterol se vyznačuje širokým spektrem zdraví prospěšných vlastností. Působí jako antioxidant a má protizánětlivé účinky (Tang et al., 2012). Také byly nalezeny fenolové sloučeniny, které vykazují ochranný účinek u několika lidských onemocnění, jako je například rakovina, kardiovaskulární choroby nebo zánětlivé procesy (Ana Villares et al., 2012).

Některé druhy lanýžů jsou charakteristické tvorbou houbových půdních kolonií v okolí hostitelských stromů, v němž je velmi omezená bylinná vegetace. Povrch půdy zde

vypadá, jako kdyby byl zasažen herbicidem. Tyto plochy jsou označovány jako „brûlé“ (francouzsky spálenina). Spáleniny jsou způsobeny alelopatickými a chemickými účinky některých těkavých organických sloučenin (např. 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 2-metyl-1-butanol), které lanýže produkují (Gryndler et al., 2004; Pomarico et al., 2007; García-Montero et al., 2009).

## 1.2 Charakteristika druhu *Tuber aestivum*

Stejně jako ostatní mykorrhizní druhy, roste lanýž letní v ektomykorrhizním spojení s kořeny hostitelských stromů. Preferuje lesy s hostitelskými stromy jako je: dub letní (*Quercus robur*), líska obecná (*Corylus avellana*), habr obecný (*Carpinus betulus*), buk lesní (*Fagus sylvatica*) a lípa srdčitá (*Tilia cordata*) (Hilszczańska et al., 2008), vzácně i s borovicí černou (*Pinus nigra*), borovicí lesní (*Pinus sylvestris*), jalovcem obecným (*Juniperus communis*), jasanem ztepilým (*Fraxinus excelsior*) (Kotlaba, 1995).

Kromě Francie byl lanýž letní často v Evropě přehlížen. Až v posledním desetiletí byl nově objeven na různých stanovištích po celé Evropě a je považován za nejčastějšího evropského lanýže s komerční hodnotou (Streiblová et al., 2010).

*T. aestivum* patří k druhům, které lze běžně nalézt v evropských lanýžových oblastech, jako je Itálie, Francie, Španělsko, ale také v Anglii, Portugalsku, Německu, ve Švýcarsku, Polsku, ČR, Maďarsku, Rumunsku, Rakousku na Ukrajině, Krymu, na pobřeží Černého moře, na Švédském ostrově Gotland, v Dánsku a na Slovensku (Kotlaba, 1995, Gažo et al., 2005; Streiblová et al., 2010). Izolovaně je můžeme objevit v městských lokalitách (Pál-Fam, 2001).

Ve střední Evropě *Tuber aestivum* preferuje vápňité, úrodné půdy. Plodnice se nachází ve vrstvě humusu obvykle v hloubce 1-2 cm, na podzim v hloubce 15-20 cm (Streiblová et al., 2010). Lanýž letní má 2 formy: *T. aestivum* f. *aestivum* a *T. aestivum* f. *uncinatum*, která je nejvíce ceněna (Paolocci et al., 2004).



### 1.2.1 Vlastnosti *Tuber aestivum*

V posledních letech byla zaznamenána významná poptávka po plodnicích *T. aestivum* díky pozornosti, kterou mu věnují badatelé a kuchaři (Rivera et al., 2011).

Lanýž letní nemá tak silné aroma a chuť jako *Tuber melanosporum* a *Tuber magnatum* (Culleré et al., 2010). Je sbírán od května do září a prodejní cena se pohybuje od 75 do 155 euro/kg (Streiblová et al., 2010). K jednoznačným výhodám lanýže letního patří značné geografické rozložení (Rioussset et al., 2001; Rivera et al., 2011), určitá tolerance k široké škále teplot, relativní odolnost proti suchu, tolerance k nadmořským výškám až do 1 000 m nad mořem, k různé půdní textuře a struktuře, k různým typům půdního chemismu a k širokým variacím složení vegetace na lokalitě (Bratek et al., 2001, Wedén et al., 2004; Gažo et al., 2005; Streiblová et al., 2012). Houba je přes zimu v klidovém stavu a má ve srovnání s *T. melanosporum* relativně vyšší toleranci k mrazu (Berthaud et al., 1998).

Ze všech zástupců rodu *Tuber* lze pěstovat v semikultuře lanýž letní nejnadhěji. Kromě Francie, kde je forma *uncinatum* pěstována tradičně, v tomto směru pokročilo z okolních zemí nejdále Maďarsko s rozsáhlými pokusnými výsadbami očkovaných stromků. Tyto výsadby však dosud nebyly produkčně úspěšné. Sklizeň lanýže letního z přirozených stanovišť přináší značné zisky z východoevropských zemí zejména Maďarsku a Rumunsku a export nestačí krýt potřeby mezinárodního trhu (Streiblová et al., 2010, 2012).

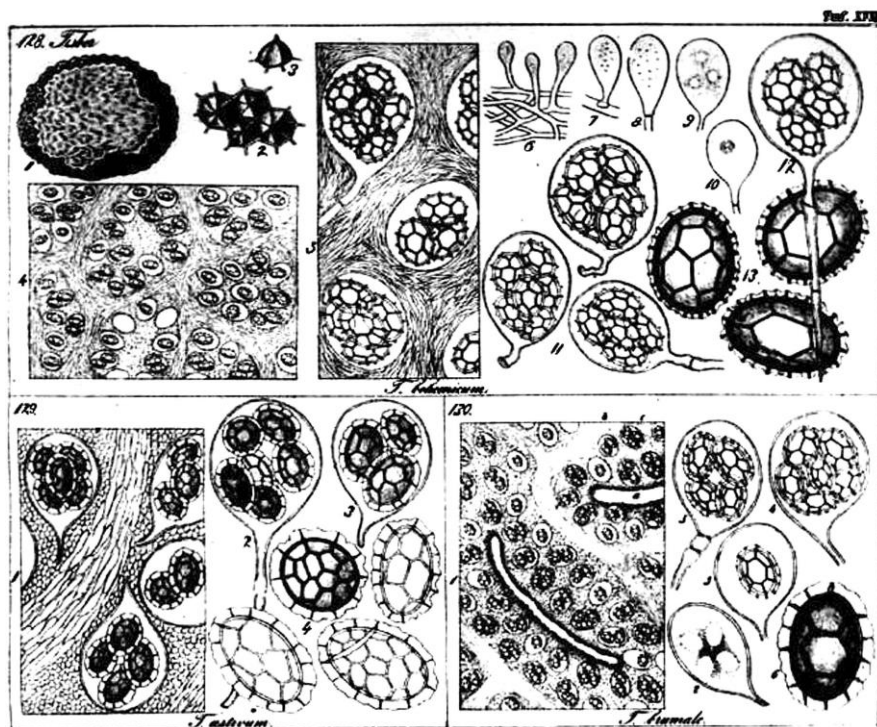
### 1.2.2 Morfologické znaky

Lanýž letní tvoří podzemní a obvykle kulovité nebo hlízovitě zploštělé, pevné, tuhé, 20–80 mm široké askokarpy (obr. 1). Vnější stěna plodnice (peridium) je černohnědá s výraznými pyramidálními až mnohoúhelníkovitými, 4–7 mm širokými bradavkami (obr. 1) (Holec et al., 2012).

Vnitřní plodná část plodnice (gleba) je v období nezralosti bílá, později nažloutlá a žlutá, šedá nebo oříškově hnědá a v dospělosti je mramorovaná. Může dosáhnout velikosti bramboru, vážit až 0,5 kg a mít 20 až 100 mm v průměru. Vřečka (asky) dosahují velikosti 60 až 100 × 50–80 μm a jsou převážně kulovitého nebo hruškovitého tvaru (obr. 2). Výtrusy (askospory) jsou elipsoidní se síťovitou ornamentací, zpočátku hyalinní. V období zralosti jsou žluto-hnědé, dosahující velikosti 24–50 × 14–32 μm (Montecchi et Saracini, 2000).



Obr. 1. *Tuber aestivum* Vitt. (forma *uncinatum*), plodnice je černohnědá, na níž jsou pyramidové bradavice. Fotografii poskytl M. Gryndler.



Obr. 2. 128: *Tuber bohemicum* (synonymum *Tuber aestivum*) Corda (1854) - (1) části plodnice, (2) polygonální pyramidální bradavky na peridiu, (3) pyramidální bradavka s výrazným vrcholem, (4, 5) části gleby s vřecky, (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) vřecka v různých stádiích vývoje, (13) tři výtrusy (askospory).

129: *Tuber aestivum* Tulasne (1) část plodné gleby, (2, 3) vřecka s výtrusy, (4) askospory.

130: *Tuber brumale*.

Všechny kresby A. C. J. Corda (1854)

### 1.2.3 Výskyt *Tuber aestivum* na našem území

Počátkem 19. století byl na našem území *Tuber aestivum* (pod synonymem *Tuber cibarium* Pers.) poprvé popsán Krombholzem (1821). Později ve slavné Cordově (1854) práci *Icones fungorum hucusque cognitorum* byly popsány dvě odrůdy rodu *Tuber*: varianta a) *Tuber bohemicum* (Corda) a varianta b) *Tuber aestivum* (Tulasne). Ke konci 19. století byly lanýže nalezené na našem území Vilhelmem (1899), Velenovským (1920–1922). V období 1926–1927 byly zveřejněny významné příspěvky k poznání lanýžů v českých časopisech Klikou (1927), dále pak v letech 1947–1951 Vackem (1950) a Šebkem (1992) (Streiblová et al., 2010). Od těchto let až do publikace prací Gryndlera et al. (2011, 2013), nebyla u nás rodu *Tuber* věnována pozornost.

V České republice je lanýž letní (*T. aestivum*) zřejmě nedílnou součástí většiny ekosystémů vázaných na vápencový podklad s typickou teplomilnou květenou (Streiblová et al., 2010). Lanýž letní byl na území České republiky hlášen na Křivoklátsku, v Národní přírodní rezervaci Karlštejn, v Chráněné krajinné oblasti Kokořínsko (Valda, 2006, 2009), na Pardubicku, Poděbradsku (Velenovský 1920–1922, Klika 1927), v oblasti Kladna (Pilát 1965), v oblasti Polabských nížin (Šebek 1992), dále v okolí Brna, Dražanské vysočiny, v Chráněné krajinné oblasti Moravský kras, v oblasti Chřibů a v podhůří Karpat (Streiblová et al., 2010). Dosud nejsevernější publikované lokality České republiky jsou: hora Říp u Roudnice nad Labem (Kotlaba, 1995) a Teplicko (Skála, 2001).

V současné době je lanýž letní (*Tuber aestivum* Vitt.) na území České republiky chráněný. Dle vyhlášky č. 395/1992 Sb., ve znění vyhlášky 175/2006 Sb. je řazen mezi kriticky ohrožené druhy, pravděpodobně kvůli nepříznivému působení celkového znečištění přírodního prostředí, špatného hospodaření v lesích, sběru plodnic a zřejmě i zvyšování kyselosti půdy. Jeho ochrana není dostatečně zabezpečena, protože jen málo lokalit, kde se vyskytuje, leží v chráněných územích. (Kotlaba, 1992, 1994, 1995).

## 1.3 Charakteristika vybraných oblastí severních Čech

### 1.3.1 Klimatická charakteristika

V těchto oblastech Ústeckého kraje s nadmořskou výškou do 250–300 m převládá teplé klima. Základním znakem oblastí jsou průměrné červencové teploty vzduchu nad 18 °C, průměrné lednové teploty -2 až -3 °C, počet letních dnů v roce nad 50 a počet mrazivých dnů v roce pod 110. Oblasti s nadmořskou výškou zhruba mezi 300–600 m, jsou řazeny do mírně teplé oblasti, která je charakterizovaná průměrnou červencovou teplotou vzduchu 16–18 °C, průměrnou lednovou teplotou -2 až -6 °C, 20 až 50 letními dny v roce a 110 až 160 mrazovými dny v roce. (Kuncová, 1999).

Průměrné úhrnné hodnoty ročního globálního záření se pro nížiny ČR uvádějí ve výši 420–430 kJ.cm<sup>-2</sup>. Hodnoty pro většinu Ústeckého regionu jsou nižší, než je celorepublikový průměr (České středohoří 420 kJ.cm<sup>-2</sup>, Mostecká pánev 377 kJ.cm<sup>-2</sup>), což je důsledkem částečného výskytu velké oblačnosti a mlh. Ve větší míře se uplatňuje i znečištění ovzduší (Kuncová, 1999).

Srážky se vyznačují velkou proměnlivostí a to z hlediska prostorového a časového. Průměrný počet dnů se srážkami 1 mm a více činí v těchto oblastech 90–100 dnů. Srážkový úhrn ve vegetativním období je 350–400 mm a v zimním období 200–300 mm. Podkrušnohoří představuje v celoročním úhrnu 60–70 mm na 100 m a je jeden z největších v České republice. Nejsušší oblastí je Žatecko a oblast kolem Tušimic a Kopist. (Kuncová, 1999).

### 1.3.2 Pedologická charakteristika

Na základě pH půdy podle katastrálních území ČR (mapa přístupná v MBÚ AVČR Praha zpracovaná VÚMOP, Praha) jsem vybral oblasti s pH půdy nad 6,0. Tyto půdy se v severočeském kraji vyskytují například na Lovosicku, Žatecku, v okolí Teplic, Litoměřic, Libochovic, Roudnice nad Labem, Loun, Chomutova a Mostu.

Zájmové území je pedologicky velmi různorodé a vyskytuje se na něm řada půdních typů. Nejčastějšími půdními typy na Teplicku jsou: modální kambizemě, kambizemě stagnické, pelické, antropogenní půdy a černozemě modální a karbonátové ze spraší.

Na Lovosicku: kambizemě modální, pelické, fluvizemě modální, černozemě modální a karbonátové ze spraší.

Na Litoměřicku: černozemě modální a karbonátové ze spraší, fluvizemě modální, rendziny a pararendziny, kambizemě modální, kambizemě arenické z písků a štěrkopísků, kambizemě pelické, hnědozemě modální.

V okolí Roudnice nad Labem: fluvizemě modální, rendziny a pararendziny, modální kambizemě, modální hnědozemě, černozemě modální a karbonátové ze spraší, černozemě z lehkých substrátů, kambizemě arenické z písků a štěrkopísků.

Na Libochovicku: modální kambizemě, modální fluvizemě, modální hnědozemě, černozemě modální a karbonátové ze spraší, rendziny a pararendziny a černozemě vertické ze slinitých jílu.

Na Lounsku: modální fluvizemě, modální kambizemě, rendziny a pararendziny, černozemě modální a karbonátové ze spraší a černozemě vertické ze slinitých jílu.

Na Žatecku: černozemě modální a karbonátové ze spraší, rendziny a pararendziny a modální fluvizemě.

Na Chomutovsku: černozemě modální a karbonátové ze spraší a modální smonice a modální kambizemě.

Na Mostecku: kambizemě modální, pelické, stagnické, modální smonice, černozemě modální a karbonátové ze spraší, modální černice, rendziny a pararendziny a antropogenní půdy (Kuncová, 1999).

### 1.3.3 Typy vegetace ve vybraných oblastech

Potenciální a přirozená vegetace ve vybraných oblastech je také velmi různorodá a vyskytuje se zde v různých typech, které byly vypsány z knihy „Mapa potenciální přirozené vegetace České republiky“, jejímiž autory jsou Z. Nehäuslová a kolektiv (2001).

Prvním typem je černýšová dubohabřina (*Melampyro nemorosi-Carpinetum*), která se vyskytuje ve výškách (200) 250–450 m n. m. Tvoří ji stinné dubohabřiny s dubem zimním (*Quercus petraea*), habrem (*Carpinus betulus*), lípou (*Tilia cordata*) a dubem letním (*Quercus robur*). Ve vyšších nebo inverzních polohách se též objevuje buk (*Fagus sylvatica*) a jedle (*Abies alba*).

Druhý typ je lipová bučina s lípou velkolistou (*Tilio platyphylli-Fagetum*), která se vyskytuje především na severních svazích v nadmořských výškách 450–650 m. Osidluje zvětralinové pláště třetihorních vyvěřelin (fonolitů a čedičů). Je tvořena stromovým a

bylinným patrem. Ve stromovém patru převládá buk (*Fagus sylvatica*), lípa velkolistá (*Tilia platyphyllos*), a také dub zimní (*Quercus petraea*) a lípa srdčitá (*Tilia cordata*).

Třetím typem je mochnová doubrava (*Potentillo albae-Quercetum*), která se vyskytuje převážně v intervalu nadmořských výšek 200–400 m. Typickými stanovišti jsou mírně skloněné báze svahů křídových plášťů terciérních vulkanitů v Českém středohoří a křídové usazeniny České tabule. Zahrnuje druhově bohaté doubravy s dubem zimním (*Quercus petraea*) nebo letním (*Quercus robur*), někdy může být přimíšen habr (*Carpinus betulus*) nebo lípa srdčitá (*Tilia cordata*), vzácněji i buk (*Fagus sylvatica*) a jeřáby (*Sorbus torminalis*, *Sorbus aria*). V keřovém patru je vyskytuje *Frangula alnus*, častěji *Corylus avellana*.

Čtvrtým typem je košťálová borová doubrava (*Festuco ovinae-Quercetum roboris*), která je typickým společenstvem kyselých, někdy i mírně vápnatých, ale celkově chudých písčitých substrátů s malou vododržností. Vyskytuje v nadmořských výškách 180–230 m a zahrnuje světlé borové doubravy s přirozeným výskytem dubu letního (*Quercus robur*), dubu zimního (*Quercus petraea*), borovice (*Pinus sylvestris*) a jednotlivě i bříza (*Betula pendula*).

Pátým typem je stěmchová jesenina (*Pruno-Fraxinetum*), místy v komplexu s mokřadními olšinami (*Alnion glutinosae*), která se vyskytuje v nadmořských výškách mezi 220–230 m. Najdeme zde jasan (*Fraxinus excelsior*), olši (*Alnus glutinosa*), lípu srdčitou (*Tilia cordata*) nebo dub letní (*Quercus robur*).

Šestým typem je topolová doubrava (*Quercu-Populetum*). Je typickým společenstvem nižších, často zaplavovaných poloh v širokých nivách říčních úvalů. Vyskytuje se zde dub letní (*Quercus robur*), topol černý (*Populus nigra*), stěmcha (*Padus avium*) a jasan (*Fraxinus excelsior*).

Sedmým typem je jilmová doubrava (*Quercu-Ulmetum*). Jde o společenstvo jen zřídka zaplavovaných říčních niv v nížinách teplé klimatické oblasti, s optimem výskytu v nadm. výškách pod 220 m n. m. Dominantní druhem je zde dub letní (*Quercus robur*) a jasan (*Fraxinus excelsior*). Častou příměs tvoří lípa srdčitá (*Tilia cordata*), olše lepkavá (*Alnus glutinosa*), habr (*Carpinus betulus*) a javor babyka (*Acer campestre*).

Osmým typem je lipová doubrava (*Tilio-Betuletum*). Vyskytuje se na chudších, většinou sušších půdách minerálně slabších substrátů. Nalezneme zde dub zimní (*Quercus*

*petraea*), řidčeji dub letní (*Quercus robur*), lípu srdčitou (*Tilia cordata*) a v malé míře i habr (*Carpinus betulus*).

Devátým typem jsou nerozlišené bazifilní teplomilné doubravy (*Brachypodio pinnati-Quercetum*). Vyskytují se na svazích s mírným, ale i strmějším sklonem. V létě mají tendenci k vysychání. Jsou tvořeny dominantním dubem zimním (*Quercus petraea*) nebo dubem letním (*Quercus robur*).

Desátým typem je biková a/nebo jedlová doubrava (*Luzulo albidiae-Quercetum petraeae, Abieti-Quercetum*). Nalezneme zde dub zimní (*Quercus petraea*) a v menší míře břízu (*Betula pendula*), habr (*Carpinus betulus*), buk (*Fagus sylvatica*), jeřáb (*Sorbus aucuparia*), lípu srdčitou (*Tilia cordata*) a borovici (*Pinus sylvestris*).

Jedenáctým a zároveň posledním typem je brusinková borová doubrava (*Vaccinio vitis-idaeae-Quercetum*). V severních Čechách se vyskytuje ve výškách kolem 260–300 m n. m. Je vázána na mírně teplou klimatickou oblast. Porost je tvořen dominantním dubem zimním, řidčeji letním (*Quercus petraea, Q. robur*), borovicí (*Pinus sylvestris*), břízou (*Betula pendula*) a jeřábem (*Sorbus aucuparia*).

## 2. PRAKTICKÁ ČÁST

Studium výskytu zástupců rodu *Tuber*, včetně lanýže letního (*Tuber aestivum*), v půdních vzorcích a vzorcích ektomykorhiz.

### 2.1 Úvod

Cílem praktické části byla aplikace specifické molekulárně genetické metody, založené na PCR se selektivními primery, při detekci zástupců rodu *Tuber* včetně lanýže letního (*Tuber aestivum*), potvrdit jejich výskyt a rozšíření v severních Čechách, zjistit zda jsou lanýže přítomny v půdách svahů a pokusit se postihnout podmínky prostředí, které jsou důležité nebo určující pro výskyt zástupců rodu *Tuber* včetně *Tuber aestivum* (pH půdy, koncentrace vápníku, trofický potenciál půdy, vodivost půdního výluhu jako indikátor salinity, nadmořská výška lokality, výskyt potenciálních hostitelských rostlin a charakter podrostu).

Zaměřil jsem se na oblasti, kde by podle mapy půdního pH vycházející z dat poskytnutých katastrálními úřady měly převládat lokality s mírně kyselými až mírně zásaditými půdami (pH v rozmezí 6,0 až 8,0), a v těchto oblastech jsem vybíral lokality s vhodnými hostiteli: dub (*Quercus* spp.), líska (*Corylus* spp.), lípa (*Tilia* spp.), habr (*Carpinus betulus*) a buk (*Fagus sylvatica*).

Provedl jsem odběr vzorků kořenů (ektomykorhiz) potenciálních hostitelů, z nichž jsem extrahoval DNA, kterou jsem použil jako templát v PCR se specifickými primery podle Gryndlera et al. (2011) a Zampieriho et al. (2009).

Na každé lokalitě jsem také odebral půdní vzorky, u kterých jsem provedl analýzu vybraných půdních parametrů, ze kterých jsem se snažil postihnout podmínky prostředí, které jsou důležité nebo určující pro výskyt zástupců rodu *Tuber* včetně *Tuber aestivum*.

### 2.2 Materiál a metody

Zdrojem materiálu byly půdní vzorky (190 vzorků) a vzorky ektomykorhiz (190 vzorků + 1 opakovaně odebraný vzorek označený jako vzorek č. 86 (14), viz kapitola 2.3.6) odebíraných během července až října roku 2013 a během července až září roku 2014 ve vybraných oblastech severních Čech.



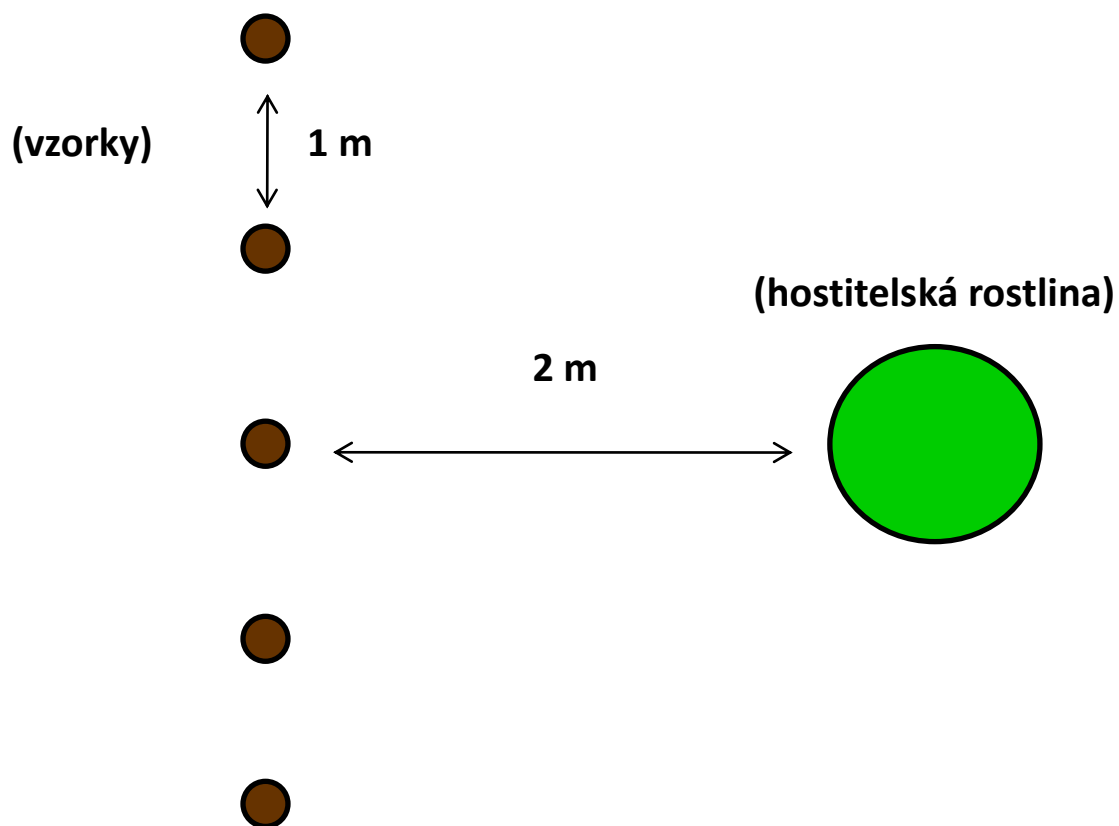
### 2.2.1 Odběr a uchování vzorků

Vzorky půdy byly odebrány pomocí tenkostěnných plastových trubek (vzorkovačů, obr. 3) o průměru 25 mm nařezaných na části o délce 15 cm. Na každé lokalitě bylo odebráno 5 vzorků tak, abychom získali 50–100 mg čerstvých mykorhizních kořenů, potřebných k extrakci DNA. Vzorky půdy jsem odebral v bodech ležících na vytyčené přímce (detailněji viz obr. 4), zatlučením vzorkovačů do země vždy po 1 m od sebe přibližně 2 m od hostitelské rostliny. Jde o standardní postup, zohledňující tvar kořenového systému. Vzorkovače jsem vytáhl a uložil je do označeného plastového sáčku. Před odvozem do laboratoře, kde bylo provedeno další zpracování, jsem doma vytlačil půdu ze vzorkovačů a vybral z ní nalezené kořeny. Ty jsem asepticky očistil od zbytků půdy a v plastových sáčcích uložil při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kromě vzorků určených ke genetické analýze jsem na lokalitě do druhého sáčku pomocí lopatky nabral přibližně 1 kg zeminy. Je důležité vždy umýt lopatku a ruce před dalším odběrem, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Před dalším zpracováním jsem zeminu usušil volně na vzduchu při pokojové teplotě a uložil do označeného sáčku. Zemina byla použita ke stanovení pH z výluhu, vodivosti, trofického potenciálu a obsahu rozpustného vápníku v půdě (viz kapitola 2.2.3).



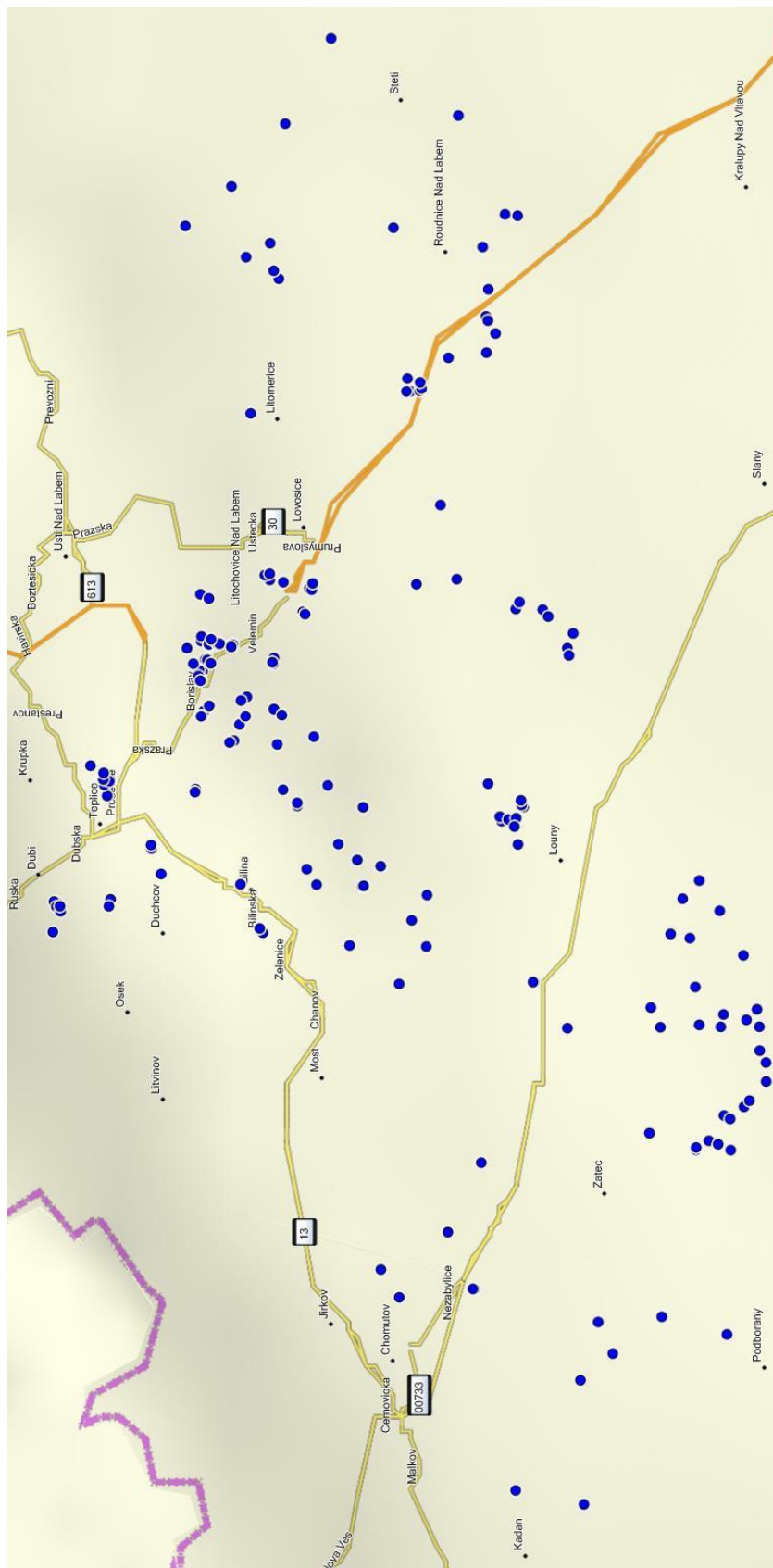
Obr. 3. 5 vzorkovačů (plastové tenkostěnné trubky o průměru 25mm a délce 15cm) připadajících na jednu lokalitu + kladivo a lopatka sloužící k zatlučení vzorků a odebrání vzorků zeminy.



Obr. 4. Rozmístění míst odběru vzorků ve vzdálenosti 2 m od hostitelské rostliny a 1 m od sebe, vzorkovače byly zatlučeny do půdy v přímce.

Půdní vzorky byly odebírány jednak v rovinatém terénu, jednak ve svažitém terénu. Za svažitý terén (svahovinu) byl považován takový terén, jehož stoupání bylo větší než 20 stupňů.

## 2.2.2 Přehled odebraných vzorků



Obr. 5. Vyznačení odběrových míst v severních Čechách.

Tab. 1. Vzorek č. 1 až 190, hostitelská rostlina, vegetace v okolí hostitelské rostliny, místo odběru, datum odběru.

Vzorek č.	Hostitel	Vegetace v okolí hostitelské rostliny	Místo odběru	Datum odběru
1	Buk lesní	semenáčky habru	obec Bořislav	5.7.2013
2	Habr obecný	holá zem	obec Bořislav	5.7.2013
3	Dub	Netýkavka malokvětá, travnatý porost	obec Bořislav	5.7.2013
4	Habr obecný	holá zem	obec Bořislav	5.7.2013
5	Habr obecný	holá zem, konvalinka vonná	obec Bořislav	5.7.2013
6	Habr obecný	semenáčky javoru	obec Bořislav	5.7.2013
7	Dub	Netýkavka malokvětá, svízel vonný	za obcí Záhoří	6.7.2013
8	Buk lesní	semenáčky javoru, svízel vonný, jaterník	za obcí Záhoří	6.7.2013
9	Buk lesní	semenáčky javoru, svízel vonný	za obcí Záhoří	6.7.2013
10	Habr obecný	holá zem, poblíž potoka	za obcí Záhoří	6.7.2013
11	Habr obecný	semenáčky habru, holá zem	za obcí Záhoří	6.7.2013
12	Habr obecný	Netýkavka malokvětá, holá zem	směr obec Žim	6.7.2013
13	Habr obecný	Netýkavka malokvětá, jaterník	obec Bořislav	7.7.2013
14	Habr obecný	holá zem, semenáčky javoru	obec Bořislav	7.7.2013
15	Dub	semenáčky javoru, holá zem	Doubravská Hora	8.7.2013
16	Dub	semenáčky javoru, dubu	Písečný Vrch	8.7.2013
17	Dub	okolo javor, modřín, pod netýkavka	Doubravská Hora	8.7.2013
18	Dub	semenáčky javoru, holá zem	Doubravská Hora	8.7.2013
19	Buk lesní	semenáčky buku, holá zem	Střelná	8.7.2013
20	Dub	semenáčky dubu, javoru, netýkavka	obec Žim	11.7.2013
21	Dub	holá zem	les směrem k Žimu	11.7.2013
22	Lípa	Netýkavka malokvětá	les směrem k Žimu	11.7.2013
23	Habr obecný	Netýkavka malokvětá	les směrem k Žimu	11.7.2013
24	Dub	Netýkavka malokvětá	za obcí Žim	11.7.2013
25	Buk lesní	Netýkavka malokvětá, holá zem	za obcí Žim	11.7.2013
26	Buk lesní	semenáčky buku, holá zem	Doubravská Hora	15.7.2013
27	Buk lesní	holá zem	Doubravská H.	15.7.2013

28	Dub	Netýkavka malokvětá	les u Starých Srbic	15.7.2013
29	Dub	semenáčky buku, dubu, ostružiník	les kousek od Mstišova	15.7.2013
30	Habr obecný	semenáčky dubu, habru, holá zem	les kousek od Mstišova	15.7.2013
31	Buk lesní	holá zem	les kousek od Mstišova	15.7.2013
32	Habr obecný	semenáčky dubu, javoru, habru	les kousek od Mstišova	15.7.2013
33	Habr obecný	semenáčky dubu, holá zem	les kousek od Mstišova	15.7.2013
34	Buk lesní	semenáčky javoru, buku, svízel vonný	pod Kostomlatským Vrchem	20.8.2013
35	Dub	semenáčky javoru, holá zem	pod Kostomlatským Vrchem	20.8.2013
36	Buk lesní	okolo javor, pod holá zem	Pod Březinou u Milešovky	20.8.2013
37	Lípa	holá zem, poblíž potoka	směr Milešov	20.8.2013
38	Dub	semenáčky javoru, dubu, lísky	za Milešovem směr Černčice	20.8.2013
39	Buk lesní	semenáčky javoru, buku	za Milešovem směr Černčice	20.8.2013
40	Buk lesní	Netýkavka malokvětá, holá zem	pod vrchem Ostrý u Milešova	20.8.2013
41	Dub	Netýkavka malokvětá, holá zem	pod vrchem Ostrý u Milešova	20.8.2013
42	Buk lesní	holá zem	pod vrchem Ostrý u Milešova	20.8.2013
43	Dub	holá zem	Vrch Kletečná	22.8.2013
44	Líska obecná	Netýkavka malokvětá, svízel, jaterník	Vrch Kletečná	22.8.2013
45	Líska obecná	Svízel vonný, netýkavka	Vrch Kletečná	22.8.2013
46	Dub	pod travnatý porost	les u Vrchu Kletečná	22.8.2013
47	Dub	Svízel vonný, semenáčky dubu, javoru	Dlouhý Vrch	26.8.2013
48	Líska obecná	Svízel vonný, holá zem	Dlouhý Vrch	26.8.2013
49	Dub	holá zem	Dlouhý Vrch	26.8.2013
50	Dub	semenáčky dubu, svízel, jaterník	Vrch Lovoš	26.8.2013
51	Dub	semenáčky dubu	les nad Opárnem	26.8.2013
52	Dub	semenáčky dubu	les nad Opárnem	26.8.2013
53	Lípa	svízel, jaterník, semen. habru	nad Opárnem	26.8.2013

54	Habr obecný	semenáčky habru, jaterník, svízel vonný	les u Radostic	26.8.2013
55	Dub	svízel vonný, jaterník, netýkavka	les u Radostic	26.8.2013
56	Habr obecný	holá zem	les u Radostic	26.8.2013
57	Lípa	holá zem	Vrch Boreč	26.8.2013
58	Dub	holá zem	Vrch Boreč	26.8.2013
59	Buk lesní	semenáčky buku, javoru	nad obcí Lelov	27.8.2013
60	Dub	semenáčky javoru, jaterník	nad obcí Lelov	27.8.2013
61	Dub	semenáčky javoru, kakost, jaterník	nad obcí Lelov	27.8.2013
62	Lípa	Netýkavka malokvětá, holá zem	nad obcí Lelov	27.8.2013
63	Dub	semenáčky javoru, dubu, netýkavka	u obce Ohnič	28.8.2013
64	Dub	semenáčky javoru, habru, holá zem	u obce Ohnič	28.8.2013
65	Dub	semenáčky dubu, travnatý porost	u obce Straky	28.8.2013
66	Dub	travnatý porost, stromečky dubu	u obce Straky	28.8.2013
67	Dub	semenáčky dubu, travnatý porost	u obce Straky	28.8.2013
68	Dub	semenáčky javoru, holá zem	Zabrušany	30.8.2013
69	Dub	travnatý porost	les u obce Oldřichov	30.8.2013
70	Dub	holá zem	les u obce Oldřichov	30.8.2013
71	Dub	Netýkavka malokvětá, habr	les za obcí Chotěšov	31.8.2013
72	Dub	okolo bez, pod netýkavka	les za obcí Chotěšov	31.8.2013
73	Habr obecný	semenáčky javoru	Vrch Planík u Sedlece	31.8.2013
74	Dub	semenáčky dubu, habru, javoru	les u obce Klapý	31.8.2013
75	Dub	semenáčky dubu, javoru	les u obce Horka	31.8.2013
76	Buk lesní	holá zem	les u obce Horka	31.8.2013
77	Dub	semenáčky dubu, ostružiník	u obce Chrastín	31.8.2013
78	Dub	ostružiník, semenáčky dubu	u obce Chrastín	31.8.2013
79	Dub	semenáčky dubu, buku, javoru, ostružiník	u Peruce	31.8.2013
80	Dub	semenáčky dubu, buku	u Peruce	31.8.2013
81	Dub	holá zem	u Peruce	31.8.2013
82	Dub	semenáčky javoru, okolo bez	Bílina, Vrch Chlum	3.9.2013
83	Dub	okolo lípa, pod semenáčky javoru	u Kaňkova	3.9.2013
84	Dub	semenáčky dubu, javoru, jahodník	u Kaňkova	3.9.2013

<b>85</b>	Dub	okolo habr, pod netýkavka, semenáčky javoru	les u Hrobčic	3.9.2013
<b>86</b>	Dub	okolo bez, pod holá zem	Mirošovice	3.9.2013
<b>87</b>	Dub	semenáčky dubu, netýkavka	les u Měrunic	3.9.2013
<b>88</b>	Dub	semenáčky dubu	les u Žichova	3.9.2013
<b>89</b>	Dub	semenáčky dubu, kakost	les u Žichova	3.9.2013
<b>90</b>	Dub	semenáčky dubu, netýkavka, jaterník	les u Žichova	3.9.2013
<b>91</b>	Dub	semenáčky javoru	Vrch Svinky	3.9.2013
<b>92</b>	Lípa	holá zem	Bedřichův Světec	3.9.2013
<b>93</b>	Buk lesní	holá zem	za Milešovem směr Lukov	6.9.2013
<b>94</b>	Dub	semenáčky dubu, buku	za Milešovem směr Lukov	6.9.2013
<b>95</b>	Dub	okolo buk, pod místy netýkavka	u Lukova	6.9.2013
<b>96</b>	Dub	semenáčky habru, holá zem	za Štěpánovem směr Mukov	6.9.2013
<b>97</b>	Dub	svízel vonný, semenáčky dubu	za Štěpánovem směr Mukov	6.9.2013
<b>98</b>	Dub	holá zem	za Štěpánovem směr Mukov	6.9.2013
<b>99</b>	Dub	travnatý porost	les u obce Červený Újezd	6.9.2013
<b>100</b>	Dub	Netýkavka malokvětá, líska	les u obce Lhota	6.9.2013
<b>101</b>	Dub	travnatý porost, semenáčky dubu	Odolice u Loun	10.9.2013
<b>102</b>	Lípa	semenáčky javoru, holá zem	Chožov	10.9.2013
<b>103</b>	Dub	semenáčky dubu, holá zem	u obce Nečichy	10.9.2013
<b>104</b>	Dub	travnatý porost, semenáčky dubu	u obce Nečichy	10.9.2013
<b>105</b>	Dub	semenáčky dubu, holá zem	u obce Nečichy	10.9.2013
<b>106</b>	Dub	semenáčky dubu, holá zem	u obce Nečichy	10.9.2013
<b>107</b>	Dub	holá zem	u obce Nečichy	10.9.2013
<b>108</b>	Dub	semenáčky dubu, borůvčí	u obce Nečichy	10.9.2013
<b>109</b>	Dub	holá zem	u obce Nečichy, Vrch Podivák	10.9.2013
<b>110</b>	Dub	jahodník, semenáčky dubu	Velký Vrch u Vršovic	10.9.2013
<b>111</b>	Lípa	semenáčky javoru, holá zem	Velký Vrch u Vršovic	10.9.2013
<b>112</b>	Dub	holá zem	Velký Vrch u Vršovic	10.9.2013
<b>113</b>	Dub	Netýkavka malokvětá, holá zem	les u Korozluk	15.9.2013
<b>114</b>	Lípa	holá zem	les u obce Bečov	15.9.2013
<b>115</b>	Dub	semenáčky dubu, lípy a javoru	les u obce Bečov	15.9.2013

116	Dub	holá zem	Postoloprty	15.9.2013
117	Dub	holá zem	Postoloprty	15.9.2013
118	Dub	travnatý porost, holá zem	Velemyšleves	15.9.2013
119	Dub	holá zem	u obce Bílence	15.9.2013
120	Dub	holá zem	les u Všehrd	15.9.2013
121	Dub	holá zem	les u Všehrd	15.9.2013
122	Dub	travnatý porost	les za obcí Údlice	15.9.2013
123	Dub	travnatý porost	les u Pesvic	15.9.2013
124	Dub	travnatý porost, netýkavka	les u Pesvic	15.9.2013
125	Dub	netýkavka, semenáčky javoru	Brozany nad Ohří	20.9.2013
126	Dub	semenáčky javoru	Brozany nad Ohří	20.9.2013
127	Dub	Netýkavka malokvětá	Brozany nad Ohří	20.9.2013
128	Dub	semenáčky javoru, netýkavka	Brozany nad Ohří	20.9.2013
129	Buk lesní	Netýkavka malokvětá	Brozany nad Ohří	20.9.2013
130	Habr obecný	holá zem	Brozany nad Ohří	20.9.2013
131	Dub	holá zem	les u obce Dušníky	20.9.2013
132	Dub	ostružiník, holá zem	u obce Přestavlky	20.9.2013
133	Dub	ostružiník, holá zem	u obce Přestavlky	20.9.2013
134	Dub	holá zem	u obce Přestavlky	20.9.2013
135	Dub	travnatý porost, semenáčky javoru	u obce Přestavlky	20.9.2013
136	Habr obecný	holá zem	Litoměřice	30.9.2013
137	Dub	semenáčky dubu, lísky	u Encovan	30.9.2013
138	Dub	semenáčky dubu, holá zem	u Encovan	30.9.2013
139	Dub	holá zem	u obce Třebutičky	30.9.2013
140	Dub	holá zem	les u Horních Řepčic	30.9.2013
141	Dub	holá zem	les nad obcí Trnobrany	30.9.2013
142	Dub	ostružiník	les u Liběšic	30.9.2013
143	Dub	travnatý porost	Exit 29 na D8 směr Roudnice	7.10.2013
144	Dub	travnatý porost, ostružiník	za obcí Kleneč	7.10.2013
145	Dub	ostružiník	Hora Říp	7.10.2013
146	Dub	semenáčky javoru	Hora Říp	7.10.2013
147	Dub	holá zem	za obcí Bechlín	7.10.2013
148	Líska obecná	holá zem	les u obce Újezd	7.10.2013



<b>149</b>	Líska obecná	holá zem	les u obce Vědlice	7.10.2013
<b>150</b>	Dub	ostružiník	za obcí Vetlá	7.10.2013
<b>151</b>	Dub	travnatý porost	obec Bořislav	24.7.2014
<b>152</b>	Dub	bažanka	U Postoloprť	24.7.2014
<b>153</b>	Dub	netýkavka	les u Dobříčan	24.7.2014
<b>154</b>	Dub	holá zem	za obcí Holedeč	24.7.2014
<b>155</b>	Dub	holá zem	za obcí Holedeč	24.7.2014
<b>156</b>	Dub	semenáčky dubu, holá zem	za obcí Lhota	24.7.2014
<b>157</b>	Dub	holá zem	u obce Sádek	24.7.2014
<b>158</b>	Habr obecný	holá zem	u obce Sádek	24.7.2014
<b>159</b>	Dub	holá zem	u obce Lhota	24.7.2014
<b>160</b>	Buk lesní	holá zem	nad obcí Sádek	24.7.2014
<b>161</b>	Dub	holá zem	nad obcí Sádek	24.7.2014
<b>162</b>	Dub	holá zem	nad obcí Sádek	24.7.2014
<b>163</b>	Habr obecný	holá zem	les u Nečemic	24.7.2014
<b>164</b>	Dub	holá zem	les u Nečemic	24.7.2014
<b>165</b>	Habr obecný	holá zem	les u Nečemic	24.7.2014
<b>166</b>	Lípa	holá zem	u Měrunic směrem na Řisuty	22.8.2014
<b>167</b>	Dub	semenáčky javoru	obec Lipno	22.8.2014
<b>168</b>	Dub	holá zem	obec Lipno	22.8.2014
<b>169</b>	Dub	holá zem	za obcí Tuchořice	22.8.2014
<b>170</b>	Dub	semenáčky dubu, buku	obec Pnětluky	22.8.2014
<b>171</b>	Dub	holá zem	v okolí obce Pnětluky	22.8.2014
<b>172</b>	Dub	holá zem	v okolí obce Pnětluky	22.8.2014
<b>173</b>	Dub	holá zem	v okolí obce Pnětluky	22.8.2014
<b>174</b>	Dub	holá zem	v okolí obce Pnětluky	22.8.2014
<b>175</b>	Buk lesní	holá zem	u obce Domoušice	22.8.2014
<b>176</b>	Buk lesní	holá zem	u obce Solopysky směr Ročov	22.8.2014
<b>177</b>	Buk lesní	holá zem	v okolí obce Břínkov	22.8.2014
<b>178</b>	Buk lesní	holá zem	v okolí obce Břínkov	22.8.2014
<b>179</b>	Buk lesní	holá zem	u obce Hřivice	22.8.2014
<b>180</b>	Dub	holá zem	U obce Hřivice	22.8.2014

<b>181</b>	Dub	holá zem	u obce Markvarec	22.8.2014
<b>182</b>	Habr obecný	semenáčky dubu	za obcí Kletečná směr Radejčín	4.9.2014
<b>183</b>	Lípa	netýkavka	za obcí Kletečná směr Radejčín	4.9.2014
<b>184</b>	Dub	travnatý porost	obec Dolánky u Podbořan	4.9.2014
<b>185</b>	Dub	travnatý porost	u obce Kličín	4.9.2014
<b>186</b>	Dub	semenáčky lípy	les u obce Chudeřín	4.9.2014
<b>187</b>	Lípa	holá zem	les za obcí Přeskaky	4.9.2014
<b>188</b>	Lípa	holá zem	les u obce Vikletice u Nechranic	4.9.2014
<b>189</b>	Dub	travnatý porost	les nad obcí Vinaře	4.9.2014
<b>190</b>	Dub	holá zem	les u Tušimic	4.9.2014

Na 128 lokalitách byl jako hostitelská rostlina zaznamenán dub, 22x buk a habr byl zjištěn celkem na 22 lokalitách. Líska byla zaznamenána na 5 lokalitách a lípa celkem na 13 lokalitách.

## **2.2.3 Zpracování odebraných vzorků**

### **2.2.3.1 Stanovení pH výluhu půdních vzorků**

K 25 ml destilované vody bylo přidáno 10 g suché půdy, směs se nechala 20 minut třepat na třepačce o frekvenci 6 Hz. Poté se nechají 2 hodiny sedimentovat hrubší částice. Po sedimentaci byla změřena hodnota pH kombinovanou elektrodou GP Combo w / RJ (Corning, USA), která byla ponořena na rozhraní mezi sedimentem a suspenzí.

Po změření pH byla směs centrifugována 5 minut při 3000 otáčkách. Následně byl slit supernatant přes filtr. Výsledný roztok byl použit ke stanovení vodivosti, trofického potenciálu a obsahu rozpustného vápníku v půdě.

### **2.2.3.2 Stanovení vodivosti**

Elektrická vodivost supernatantu byla měřena za použití konduktometru OK-102/1 (Radelkis, Maďarsko), (Gryndler et al., 2013). V prvním kroku byla provedena kalibrace

přístroje k hodnotě vodivosti 500  $\mu\text{S}$ . Poté byla připravena kádinka s ultračistou vodou pro omytí elektrody a dobře omytý a vyčištěný odměrný válec, do kterého byl nalit výsledný roztok, získaný z výluhu půdních vzorků. Následně byla elektroda ponořena celá do válce a byla změřena a zapsána vodivost daného vzorku.

### 2.2.3.3 Stanovení obsahu rozpustného vápníku v půdě

Koncentrace mobilního Ca byla měřena v supernatantech, u nichž byla předem nastavena hodnota pH v rozmezí 6,8 až 7,2 (za použití 1% HCl nebo 1% NaOH) a byla měřena pomocí Ca-selektivní elektrody (typ 20–35, Monokrystaly, Turnov, Česká republika). Elektroda byla kalibrována pomocí roztoků o známé koncentraci Ca (Gryndler et al., 2013). Po změření rozpustného vápníku v půdě, bylo odebráno 5 ml každého vzorku pro účely stanovení trofického potenciálu.

### 2.2.3.4 Stanovení trofického potenciálu půdních vzorků

Trofický potenciál, byl stanoven pomocí biologického testu, který byl publikován v práci Gryndlera et al. (2013). V testu byl sledován růst kultury zelené řasy *Chlorella kessleri* (kmen Larg/-1, viz příloha 4). Kultura se nechala růst po dobu 4 dnů při teplotě 25 °C při denním osvětlení ve 200 ml sterilního kapalného média (Z8m), které obsahuje (v 1 litru deionizované vody):  $\text{NaNO}_3$  – 467 mg,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 59 mg,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 31 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 25 mg,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 21 mg, FeNaEDTA – 6,7 mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 3,1 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 2,4 mg,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 3,5  $\mu\text{g}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 8,8  $\mu\text{g}$ , KBr – 12  $\mu\text{g}$ , KJ – 8,3  $\mu\text{g}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 28,7  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$  – 11,5  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 11,9  $\mu\text{g}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 12,5  $\mu\text{g}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 12  $\mu\text{g}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  – 2  $\mu\text{g}$ ,  $\text{NaVO}_3$  – 1,2  $\mu\text{g}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  – 17  $\mu\text{g}$ . Živné médium obsahuje 6 milimolů dusíku, 0,18 milimolů fosforu, 0,1 milimolů hořčíku a 0,25 milimolů vápníku na 1 litr.

Narostlá kultura byla centrifugována po dobu 5 minut při 180 x g a asepticky rozsuspendována ve 200 ml sterilní deionizované vody. Pak se nechala po dobu 2 dnů hladovět na minerální živiny při teplotě 25 °C za denního osvětlení. Po 2 dnech hladovění byla kultura 1x promyta ve sterilní deionizované vodě a zředěna na požadovanou absorbanci rovnou 0,180 (při vlnové délce 655 nm), což odpovídá koncentraci  $4 \times 10^5$  buněk na 1 ml. Získaná suspenze byla v testu použita jako inokulum.

Pět ml půdního výluhu od každého vzorku bylo autoklávováno při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Do 96–jamkové transparentní sérologické destičky s rovným dnem bylo pipetováno 100 µl vzorku. Pokaždé byly použity čtyři jamky na jeden vzorek půdního výluhu (analytické opakování). Dále, 6 jamek s deionizovanou vodou (jako kontrola) a jako standardy byla použita sériová ředění výše uvedeného kultivačního média (ředění 1:2, 1:9 a 1:29), se šesti analytickými opakováními od každého. Poté bylo do každé jamky přidáno 25 µl řasového inokula.

Počáteční absorbance byla měřena při 655 nm. Po změření absorbance, byly vzorky inkubovány v exsikátoru po dobu 7 dnů při teplotě 25 °C, osvětlení 3000 lux (studené bílé zářivky), relativní vlhkosti 100% a koncentraci 5% CO<sub>2</sub> v atmosféře. Poté byla změřena absorbance při 655 nm. Od této hodnoty byla odečtena počáteční hodnota absorbance. Výsledná hodnota udávala přírůstek absorbance. Průměrná hodnota přírůstku absorbance vypočtená ze čtyř analytických opakování téhož vzorku je mírou trofického potenciálu vzorku.

### **2.2.3.5 Extrakce DNA z kořenů**

Pro extrakci DNA z mykorhizních kořenů, byla použita modifikovaná metoda podle Gardesové a Brunse (1993) s použitím skleněného mléka (glassmilk) jako sorbentu DNA. Postup proběhl v následujících krocích:

1. Bylo vybráno 50–100 mg čerstvých očištěných kořenů do sterilní třecí misky.
2. K vybraným kořínkům bylo přidáno 500 až 700 µl CTAB lyzačního pufru s pH 8,0.
3. Směs pufru a kořínků byla homogenizována sterilním tloučkem.
4. Homogenát byl pomocí pipety přenesen do 1,5 ml sterilní mikrozkušavky.
5. Vzorek byl inkubován 1 hodinu při 65 °C v blokové lázni.
6. Po skončení inkubace bylo přidáno 500 µl (= 1 objem) chloroformu.
7. Vzorek byl 10 sekund intenzivně míchán míchačkou typu „Vortex“ (viz příloha 1) při maximální rychlosti.

8. Vzniklá suspenze byla centrifugována 15 minut při maximálních otáčkách malé stolní centrifugy (cca 10000 x g).
9. Část čirého supernatantu (svrchní vrstvy) o objemu 200  $\mu$ l byla přenesena do nové sterilní mikrozkušavky o objemu 1,5 ml.
10. K supernatantu v nové mikrozkušavce byl přidán 1 ml Bind pufru s pH 6,0.
11. K supernatantu s Bind pufrem bylo přidáno 10  $\mu$ l 50% skleněného mléka.
12. Vše bylo krátce promícháno.
13. Roztok byl inkubován 5 minut při laboratorní teplotě a občas promícháván otáčením mikrozkušavky.
14. Po skončení inkubace byl roztok centrifugován 5 sekund při maximálních otáčkách, čímž došlo k peletaci skleněného mléka. Supernatant byl odstraněn.
15. K peletě (sedimentu) bylo přidáno 500  $\mu$ l Neet wash promývacího pufru (pH 7,5) a peleta byla rozsuspendována pomocí špičky pipety.
16. Suspenze byla centrifugována 5 sekund při maximálních otáčkách a supernatant byl odstraněn.
17. Promytí bylo ještě jednou opakováno (kroky 15 + 16).
18. Zbytek promývacího pufru Neet wash byl odstraněn krátkou centrifugací a odsátím pipetou.
19. Peleta byla krátce sušena 3–4 minuty na rotační vakuové odparce.
20. Suchá peleta byla rozsuspendována v 50  $\mu$ l pufru TE (pH 7,4).
21. Suspenze byla inkubována 5 minut při 65 °C.
22. Suspenze byla centrifugována 30 sekund při maximálních otáčkách.
23. Supernatant (hotový extrakt obsahující purifikovanou DNA, celkem 45  $\mu$ l) byl pak opatrně přenesen do nové sterilní mikrozkušavky a dále uchováván při -20 °C.

### Složení pufrů:

#### **CTAB pufr** (pH 8,0):

100 mM Tris – HCl (pH 8,0)  
20 mM EDTA (pH 8,0)  
1,4 M NaCl  
2% acetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

#### **Neet wash** (pH 7,5):

100 mM NaCl  
1 mM EDTA  
10 mM Tris – HCl (pH 7,5)  
50% etanolu

#### **Bind pufr** (pH 6,0):

saturovaný roztok NaCl  
10 mM Bis – Tris  
pH upravit pomocí HCl

#### **TE pufr** (pH 7,4):

10 mM Tris – HCl  
1 mM EDTA

### Příprava pufrů a skleněného mléka:

#### Zásobní roztoky:

**5M NaCl**.....29,2 g NaCl (m.w. 58,44 g/mol) + 100 ml H<sub>2</sub>O

**1M Tris – HCl pufr**.....12,1 g Trizma base asi v 90 ml H<sub>2</sub>O  
+ 4,6 ml konc. HCl (pro pH 8)  
nebo 0,86 ml HCl (pro pH 9)  
doplnit do 100 ml vodou

**0,5 M EDTA (pH 8,0):** Kombinace 9,3 g Na<sub>2</sub>EDTA . 2H<sub>2</sub>O (m.w. 372,2 g/mol) + 1 g NaOH (m.w. 40 g /mol), H<sub>2</sub>O do objemu 50ml.

*Příprava:* NaOH se rozpustí ve vodě a přidá se EDTA. Roztok se umístí na magnetickou míchačku, kde se za stálého míchání při opatrném zahřívání rozpustí veškerá EDTA. Nakonec se upraví pH na 8,0 pomocí koncentrovaného roztoku NaOH.

#### Pufry:

#### **CTAB pufr** (pH 8,0).....**200 ml:**

1,4 M NaCl.....56 ml 5 M NaCl  
20 mM EDTA.....8 ml 0,5 M EDTA  
100 mM Tris – HCl..... 20 ml 1 M Tris - HCl  
voda.....116 ml

---

Roztok se autoklávuje. Po sterilizaci v autoklávu se přidá 4 g CTAB (je rozpustný za tepla, je proto třeba směs pomalu zahřívát).

**TE pufr (pH 7,4).....100 ml:**

10 mM Tris – Cl.....1 ml of 1 M (pH 7,4 – 8 při 25 °C)

1 mM EDTA.....200 µl of 0,5 M (pH 8)

H<sub>2</sub>O.....98,8 ml

---

Roztok se autoklávuje.

**Bind pufr (pH 6,0).....200 ml:**

Nejprve se připraví nasycený roztok NaCl tak, že se do vody za neustálého míchání a zahřívání (na magnetické míchačce) přidává NaCl, až se na dně nádoby objeví vrstvička NaCl, který se dále nerozpouští (tuto vrstvu neodstraňovat). Ke 200 ml nasyceného roztoku se pak přidá 0,418 g Bis – Tris (10 mM)

---

pH 6,0 se nastaví pomocí HCl.

---

Roztok se autoklávuje. Po sterilizaci je třeba asepticky zkontrolovat a upravit pH, jeho hodnota je kritická.

**Neet wash (pH 7,5).....200 ml:**

100 mM NaCl.....1,168 g

1 mM EDTA.....0,074 g

10 mM Tris – HCl.....2ml 1M Tris – HCl

voda.....98 ml

---

Roztok se autoklávuje a po vychladnutí se přidá 100 ml 100% nebo 90% etanolu. Po autokláfování je nutné zkontrolovat pH pufrů, případně je dopravit. Nejdůležitější je kontrola pH Bind pufru. Všechny zásobní roztoky a pufrů se skladují v lednici.

**50% glassmilk (skleněné mléko):**

17 g práškového oxidu křemičitého (Sigma) rozsuspendujeme v 70 ml destilované vody a necháme míchat po dobu 60 minut. Necháme usadit po dobu 90 minut a odstraníme sediment. Roztok centrifugujeme při 6000 xg po dobu 10 minut a poté odstraníme supernatant. Peletu rozsuspendujeme ve 20 ml 50% kyseliny dusičné. Roztok přivedeme k varu a necháme vychladnout (v digestoři). Roztok necháme znovu centrifugovat při 6000 xg a odstraníme supernatant. Přidáme sterilní destilovanou vodu, promícháme, necháme znovu centrifugovat a odstraníme supernatant. Opakujeme předchozí krok, dokud nedosáhneme neutrálního pH supernatantu (minimálně 6 krát). Po posledním centrifugaci odstraníme supernatant a přidáme 1 objemový díl sterilní destilované vody. Důkladně promícháme a rozdělíme

na 500 µl alikvoty do sterilních mikrozkuvek. Skladujeme při teplotě -80 °C. Pro dobu 2 až 9 týdnů, můžeme pracovní alikvoty skladovat při -20 °C.

### **2.2.3.6 Spektrofotometrické měření DNA**

Měření probíhalo pomocí spektrofotometru „Nanodrop“ (Thermo Scientific), (viz příloha 2) na základě absorbance při vlnové délce 260 nm. K měření jsem použil 1,5 µl z každého vzorku DNA (templátu), získaného při extrakci DNA z mykorhizních kořenů. Získaná hodnota nám udává koncentraci DNA v ng/µl.

### **2.2.4 Metoda detekující zástupce rodu *Tuber***

Jde o metodu „nested“ PCR s primery bt2a a bt2b zacílenými na eukaryotní organismy při první amplifikaci (PCR I) a se specifickými primery tubtubf a elytubr zacílenými na rod *Tuber* v druhé amplifikaci (PCR II).

Při míchání zásobních roztoků pro tuto metodu, byla použita polymerázová směs obsahující (pufr, nukleotidy, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, stabilizátor, vkládací roztok, barvivo a „hot-start“ polymerázu). Komerční název směsi je „Combi PPP Master Mix“, výrobce: Top-Bio s.r.o., J. Jovkova 3262, 143 00 Praha 4, tel.: 603/476 934, tel./ fax: 241 77 00 91, e-mail: top-bio@top-bio.cz, web: <http://www.top-bio.cz>. Tato směs byla použita při každém užití PCR popisovaném v této práci.

Zde použitá metoda byla publikována v práci Zampieriho et al. (2009) a je vhodná pro studium výskytu zástupců rodu *Tuber*.

#### **2.2.4.1 Příprava reakční směsi PCR I**

Nejprve jsem si namíchal pracovní roztoky primerů bt2a a bt2b, každý do jiné mikrozkuvky v PCR boxu. Každá obsahovala vždy 27 µl PCR H<sub>2</sub>O a 3 µl 100 µM zásobního roztoku primeru. Konečný objem byl 30 µl, koncentrace pracovního roztoku primeru byla 10 µM.

Vytvořil jsem zásobní roztok reagentů pro 31 vzorků do 1,5 ml sterilní mikrozkuvky ze 193,75 µl polymerázové směsi, 7,75 µl pracovních roztoků primerů bt2a a bt2b a 170,5 µl PCR vody a promíchal pipetováním. Připravil jsem si 31 mikrozkuvek o objemu 200 µl.



Do 30 mikrozkušavek jsem pipetoval 12,2  $\mu$ l zásobního roztoku + 0,3  $\mu$ l vzorku DNA (templátu).

Do 31 mikrozkušavky jsem pipetoval 12,2  $\mu$ l zásobního roztoku + 0,3  $\mu$ l vody a označil jsem ji jako negativní kontrolu (NK). Tento postup byl opakován ještě 4x.

Ve dvou případech byla příprava reakční směsi pro PCR I odlišná. V prvním případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 32 vzorků: 200  $\mu$ l polymerázové směsi + 8  $\mu$ l pracovního roztoku primeru bt2a + 8  $\mu$ l pracovního roztoku primeru bt2b a 176  $\mu$ l PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

V druhém případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 40 vzorků: 250  $\mu$ l polymerázové směsi + 10  $\mu$ l pracovního roztoku primeru bt2a + 10  $\mu$ l pracovního roztoku primeru bt2b a 225,5  $\mu$ l PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

Následné pipetování do příslušného počtu mikrozkušavek jsem provedl stejně jako v prvním případě přípravy reakční směsi PCR I pro 31 vzorků. Namíchal jsem celkem 196 mikrozkušavek o konečném objemu 12,5  $\mu$ l, z toho 6 mikrozkušavek, byly negativní kontroly.

#### **2.2.4.2 Program termocykléru pro PCR I**

Namíchané vzorky z PCR I jsem vložil do přístroje zvaného „Termocykler“ (viz příloha 3), ve kterém probíhá PCR reakce a nastavil jsem program pro primery bt2a a bt2b, jehož autory jsou Glass a Donaldson (1995).

95 °C	- 4 minut
35 cyklů	94 °C - 45 sekund
	50 °C - 45 sekund
	72 °C - 90 sekund
72 °C	- 5 minut

#### **2.2.4.3 Elektroforetické ověření PCR I**

Příprava gelu: pro 35 vzorků

- 0,6 g agarózy navážit do 200 ml Erlenmeyerovy baňky.
- Přidat 60 ml TBE pufru, roztok lít po stěně a opatrně míchat.
- Zahřívát opatrně v mikrovlnné troubě (agaróza se zahříváním rozpustí).

- Po vychladnutí cca na 50 °C přidat jako barvivo ethidium bromid v koncentraci 1 µl 1% roztoku na 10 ml roztoku agarózy. V tomto případě přidat 6 µl. Poté roztok promíchat.
- Nalít roztok agarózy do příslušné vaničky a vložit hřebínek.
- Po zatuhnutí vytáhnout hřebínek a vaničku s gelem vložit do aparatury na elektroforézu (vždy orientovat jamkami k záporné elektrodě).
- Do jamek pipetovat 2 µl vzorku.

Příprava gelu: pro 70 vzorků

- 1,12 g agarózy navážit do 200 ml Erlenmeyerovy baňky.
- Přidat 112 ml TBE pufry, roztok lít po stěně a opatrně míchat.
- Zahřívát opatrně v mikrovlnné troubě (agaróza se zahříváním rozpustí).
- Po vychladnutí cca na 50 °C přidat jako barvivo ethidium bromid v koncentraci 1 µl 1% roztoku na 10 ml roztoku agarózy. V tomto případě přidat 11,2 µl. Poté roztok promíchat.
- Nalít roztok agarózy do příslušné vaničky a vložit hřebínek.
- Po zatuhnutí vytáhnout hřebínek a vaničku s gelem vložit do aparatury na elektroforézu (vždy orientovat jamkami k záporné elektrodě).
- Do jamek pipetovat 2 µl vzorku.

Elektroforéza byla provedena celkem 6x. Velikost vzorku byla 2 µl. Doba trvání byla 20 minut při napětí 80 V, barveno ethidium bromidem.

#### **2.2.4.4 Příprava reakční směsi PCR II**

Namíchal jsem pracovní roztoky primerů tubtubf a elytubr, každý do jiné mikrozkušavky v PCR boxu. Každá obsahovala vždy 27 µl PCR H<sub>2</sub>O a 3 µl 100 µM zásobního roztoku primeru. Konečný objem byl 30 µl, koncentrace pracovního roztoku primeru byla 10 µM.

Pro PCR II jsem PCR vodou naředil produkty PCR I v poměru 1:100 = 1 µl vzorku + 100 µl vody.

Připravil jsem si zásobní roztok reagentů pro 61 vzorků: 387,5 µl polymerázové směsi + 15,5 µl pracovního roztoku primeru tubtubf + 15,5 µl pracovního roztoku primeru

elytubr a 341  $\mu\text{l}$  PCR vody a promíchal pipetováním. Připravil jsem si 61 mikrozkušavek o objemu 200  $\mu\text{l}$ .

Do 60 mikrozkušavek jsem nepipetoval 12,2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku + 0,3  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku DNA (templátu) a promíchal pipetováním.

Do 61 mikrozkušavky jsem pipetoval 12,2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku + 0,3  $\mu\text{l}$  vody a označil jsem ji jako negativní kontrolu (NK). Tento postup byl opakován ještě 2x.

Ve dvou případech byla příprava reakční směsi pro PCR II odlišná. V prvním případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 32 vzorků: 200  $\mu\text{l}$  polymerázové směsi + 8  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku primeru tubtubf + 8  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku primeru elytubr a 176  $\mu\text{l}$  PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

V druhém případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 40 vzorků: 250  $\mu\text{l}$  polymerázové směsi + 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku primeru tubtubf + 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku primeru elytubr a 225,5  $\mu\text{l}$  PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

Následné pipetování do příslušného počtu mikrozkušavek jsem provedl stejně jako v prvním případě přípravy reakční směsi PCR II pro 61 vzorků. Namíchal jsem celkem 194 mikrozkušavek o konečném objemu 12,5  $\mu\text{l}$ , z toho 4 mikrozkušavky, byly negativní kontroly.

#### **2.2.4.5 Program termocykléru pro PCR II**

Nastavil jsem program pro primery tubtubf a elytubr, jehož autory jsou Zampieri et al. (2009).

94 °C	- 4 minuty
25 cyklů	94 °C - 45 sekund
	50 °C - 45 sekund
	72 °C - 90 sekund
72 °C	- 5 minut

#### **2.2.4.6 Elektroforetické ověření PCR II**

Elektroforéza v 1% agaróze, byla provedena celkem 4x. Doba trvání byla 30 minut při napětí 80V. Byl použit velikostní standard DNA marker 200–1500+ col. od společnosti Top-Bio, DNA byla barvena ethidium bromidem, velikost vzorku byla 2  $\mu\text{l}$ .

## 2.2.5 Metoda detekující druh *Tuber aestivum*

Jde o metodu „nested“ PCR s primery NSI1 a NLB4 zacílenými na eukaryotní organismy při první amplifikaci (PCR I) a se specifickými primery Tu1sekvF a Tu2sekvR pro *Tuber aestivum* v druhé amplifikaci (PCR II).

Při míchání zásobních roztoků pro tuto metodu byla použita stejná polymerázová směs jako u metody detekující rod *Tuber* jako v kapitole (2.2.4). Příprava gelů byla stejná jako v kapitole (2.2.4.3).

Zde použitá metoda byla publikována v práci Gryndlera et al. (2011). Jde o velice spolehlivou a vhodnou metodu pro studium výskytu lanýže letního (*Tuber aestivum*).

### 2.2.5.1 Příprava reakční směsi PCR I

Nejprve jsem namíchal pracovní roztoky primerů NSI1 a NLB4, každý do jiné mikrozkušavky v PCR boxu. Každá mikrozkušavka obsahovala vždy 27  $\mu\text{l}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  + 3  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{M}$  zásobního roztoku primeru. Konečný objem byl 30  $\mu\text{l}$ , koncentrace výsledného pracovního roztoku primeru byla 10  $\mu\text{M}$ .

Vytvořil jsem zásobní roztok reagensů pro 32 vzorků do 1,5 ml sterilní mikrozkušavky, z 200  $\mu\text{l}$  polymerázové směsi (viz předchozí oddíl), 8  $\mu\text{l}$  pracovních roztoků primerů NSI1 a NLB4 a 176  $\mu\text{l}$  PCR vody a promíchal pipetováním. Připravil jsem si 32 mikrozkušavek o objemu 200  $\mu\text{l}$ .

Do 30 mikrozkušavek jsem pipetoval 12,2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku + 0,3  $\mu\text{l}$  vzorku DNA (templátu).

Do 31 mikrozkušavky jsem pipetoval 12,2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku + 0,3  $\mu\text{l}$  vody a označil jsem ji jako negativní kontrolu (NK).

Do 32 mikrozkušavky jsem pipetoval 12,2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku + 0,3  $\mu\text{l}$  vzorku, který obsahoval DNA *Tuber aestivum* a označil jsem ji jako pozitivní kontrolu (PK). Tento postup byl opakován ještě 4x.

Ve dvou případech byla příprava reakční směsi pro PCR I odlišná. V prvním případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 33 vzorků: 206,25  $\mu\text{l}$  polymerázové směsi + 8,25  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku primeru NSI1 + 8,25  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku primeru NLB4 a 181,5  $\mu\text{l}$  PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

V druhém případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 41 vzorků: 256,25 µl polymerázové směsi + 10,25 µl pracovního roztoku primeru NSI1 + 10,25 µl pracovního roztoku primeru NLB4 a 225,5 µl PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

Následné pipetování do příslušného počtu mikrozkušavek jsem provedl stejně jako v prvním případě přípravy reakční směsi PCR I pro 32 vzorků. Namíchal jsem celkem 202 mikrozkušavek o konečném objemu 12,5 µl, z toho 12 mikrozkušavek, byly kontroly (6 pozitivních kontrol a 6 negativních kontrol).

### **2.2.5.2 Program termocykléru pro PCR I**

Nastavil jsem program pro primery NSI1 a NLB4, jehož autory jsou Martin a Rygielwicz (2005).

95 °C	- 4 minuty
29 cyklů	95 °C - 60 sekund
	52 °C - 45 sekund
	72 °C - 120 sekund
72 °C	- 5 minut

### **2.2.5.3 Elektroforetické ověření PCR I**

Elektroforéza byla provedena celkem 6x. Doba trvání byla 20 minut při napětí 80 V. DNA byla barvena ethidium bromidem, velikost vzorku byla 2 µl.

### **2.2.5.4 Příprava reakční směsi PCR II**

Namíchal jsem pracovní roztoky primerů Tu1sekvF a Tu2sekvR stejným způsobem jako zásobní roztoky primerů NSI1 a NLB4 při přípravě reakční směsi PCR I.

Pro PCR II jsem PCR vodou naředil produkty PCR I v poměru 1:100 = 1 µl vzorku + 100 µl PCR vody.

Připravil jsem si zásobní roztok reagensů pro 32 vzorků: 200 µl polymerázové směsi + 8 µl pracovního roztoku primeru Tu1sekvF + 8 µl pracovního roztoku primeru Tu2sekvR a 176 µl PCR vody a promíchal jsem pipetováním. Připravil jsem si 32 mikrozkušavek o objemu 200 µl.

Do 30 mikrozkušavek jsem pipetoval 12,2 µl zásobního roztoku + 0,3 µl naředěného vzorku DNA (templátu) a promíchal pipetováním.

Do 31 mikrozkušavky jsem pipetoval 12,2 µl zásobního roztoku + 0,3 µl vody a označil jsem ji jako negativní kontrolu (NK).

Do 32 mikrozkušavky jsem pipetoval 12,2 µl zásobního roztoku + 0,3 µl naředěného vzorku, který obsahoval DNA *Tuber aestivum* a označil jsem ji jako pozitivní kontrolu (PK). Tento postup byl opakován ještě 4x.

Ve dvou případech byla příprava reakční směsi pro PCR II odlišná. V prvním případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 33 vzorků: 206,25 µl polymerázové směsi + 8,25 µl pracovního roztoku primeru Tu1sekvF + 8,25 µl pracovního roztoku primeru Tu2sekvR a 181,5 µl PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

V druhém případě jsem si připravil zásobní roztok reagensů pro 41 vzorků: 256,25 µl polymerázové směsi + 10,25 µl pracovního roztoku primeru Tu1sekvF + 10,25 µl pracovního roztoku primeru Tu2sekvR a 225,5 µl PCR vody a promíchal jsem pipetováním.

Následné pipetování do příslušného počtu mikrozkušavek jsem provedl stejně jako v prvním případě přípravy reakční směsi PCR II pro 32 vzorků. Namíchal jsem celkem 202 mikrozkušavek o konečném objemu 12,5 µl, z toho 12 mikrozkušavek, byly kontroly (6 pozitivních kontrol a 6 negativních kontrol).

### 2.2.5.5 Program termocykléru pro PCR II

Nastavil jsem program pro primery Tu1sekvF a Tu2sekvR, který byl popsán v článku od Gryndlera et al. (2011).

95 °C	- 4 minuty
40 cyklů	95 °C - 40 sekund
	59 °C - 40 sekund
	72 °C - 40 sekund
72 °C	- 5 minut

### 2.2.5.6 Elektroforetické ověření PCR II

Elektroforéza v 1% agaróze, byla provedena celkem 6x a trvala 35 minut při napětí 80V. DNA byla barvena ethidium bromidem, velikostní standard: DNA marker 200–1500+ col., velikost vzorku byla 2 µl.

## 2.2.6 Druhová identifikace

Pozitivní vzorky z PCR II, získané díky metodě detekující zástupce rodu *Tuber* (gen pro beta-tubulin) a druh *Tuber aestivum* (ITS region), byly poslány na sekvenci do sekvenčního servisního střediska „MacroGen“, Seoul, Korea. Sekvence byly upraveny pomocí programu „BioEdit“. Upravené sekvence byly porovnány s genetickou databází GenBank vyhledávacím nástrojem „BLAST“.

## 2.2.7 Analýza dat

Byl analyzován výskyt jednotlivých druhů rodu *Tuber* v závislosti na různých parametrech prostředí (pH půdy, koncentrace vápníku, trofický potenciál půdy, vodivost půdního výluhu jako indikátor salinity, nadmořská výška lokality, výskyt potenciálních hostitelských rostlin a charakter podrostu).

Souvislost výskytu zástupců rodu *Tuber* s parametry prostředí byla vyhodnocena s použitím redundanční analýzy (RDA) a statistická významnost vlivu parametrů prostředí byla testována Monte Carlo testem na hladině pravděpodobnosti  $p = 0,05$ . Testování bylo provedeno v programu Canoco 4.5.

## 2.3 Výsledky

### 2.3.1 pH, vodivost, obsah rozpustného vápníku půdních vzorků

Tabulka 2 ukazuje pH, vodivost a obsah rozpustného vápníku odebraných půdních vzorků. Hodnoty pH byly často podstatně nižší, než hodnoty očekávané na základě půdní mapy.

Tab. 2. pH, vodivost a obsah rozpustného vápníku odebraných půdních vzorků.

Vzorek č.	pH	Vodivost (μS)	Ca (mg/kg)	Vzorek č.	pH	Vodivost (μS)	Ca (mg/kg)
1	3,95	198	10,01	96	3,85	308	18,53
2	4,2	230	9,52	97	4,54	244	17,66
3	4,07	170	5,37	98	4,94	342	28,87
4	4,34	230	4,68	99	3,76	250	12,85
5	3,81	202	9,62	100	4,89	192	20,21
6	5,98	240	19,40	101	5,32	168	19,83
7	4,6	146	8,29	102	6,77	340	56,12
8	5,46	220	14,00	103	3,84	178	6,48
9	5,15	180	12,68	104	3,87	275	11,02
10	5,51	256	22,27	105	4,22	307	12,85
11	5,55	134	9,16	106	3,69	258	9,55
12	4,12	170	6,48	107	4,12	330	14,68
13	5,36	204	15,30	108	4,06	275	4,63
14	4,05	158	6,61	109	3,98	140	8,47
15	4,63	132	5,93	110	5,34	215	21,36
16	4,94	170	12,68	111	7,38	240	90,24
17	4,04	200	7,44	112	4,64	148	5,99
18	4,09	168	4,91	113	5,08	155	13,09
19	3,57	258	5,70	114	7,31	313	63,16
20	5,13	210	13,73	115	5,38	147	14,82
21	3,84	164	9,58	116	4,24	210	24,65
22	5,25	138	5,48	117	4,16	200	21,36
23	4,95	142	4,87	118	4,15	195	10,54
24	4,58	189	17,52	119	4,01	321	9,71
25	4,48	147	19,25	120	4,7	337	29,55
26	4,03	116	10,05	121	4,31	250	14,45



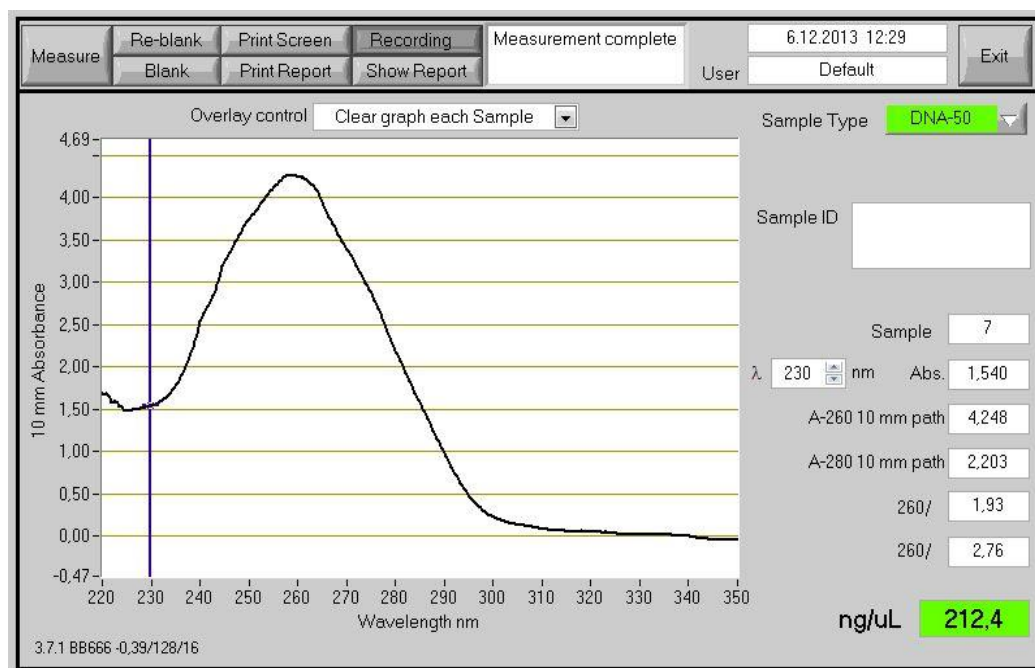
<b>27</b>	3,79	175	11,26		<b>122</b>	4,16	190	17,48
<b>28</b>	3,92	310	40,89		<b>123</b>	4,37	232	30,99
<b>29</b>	3,74	148	6,05		<b>124</b>	4,47	140	13,26
<b>30</b>	3,61	164	6,16		<b>125</b>	6,12	318	64,01
<b>31</b>	3,72	208	14,79		<b>126</b>	4,94	840	46,72
<b>32</b>	3,69	281	12,37		<b>127</b>	5,06	263	39,72
<b>33</b>	3,62	304	6,54		<b>128</b>	6,42	208	41,66
<b>34</b>	4,35	212	6,94		<b>129</b>	6	162	27,12
<b>35</b>	4,08	178	7,29		<b>130</b>	5,68	242	40,88
<b>36</b>	6,27	260	12,94		<b>131</b>	4,76	188	13,51
<b>37</b>	5,15	170	35,09		<b>132</b>	4,12	120	6,93
<b>38</b>	4,25	230	12,44		<b>133</b>	3,81	192	10,05
<b>39</b>	4,77	230	18,83		<b>134</b>	3,87	127	7,62
<b>40</b>	4,1	156	5,01		<b>135</b>	4,31	80	3,52
<b>41</b>	5,43	341	24,59		<b>136</b>	7,26	970	105,71
<b>42</b>	4,57	179	22,17		<b>137</b>	6,74	490	165,50
<b>43</b>	4,7	190	24,59		<b>138</b>	5,18	267	50,23
<b>44</b>	5,78	180	29,41		<b>139</b>	6,49	429	103,71
<b>45</b>	5,64	175	24,36		<b>140</b>	4,04	155	6,97
<b>46</b>	4,93	175	26,77		<b>141</b>	4,66	157	10,61
<b>47</b>	5,49	196	35,84		<b>142</b>	4,61	166	8,52
<b>48</b>	5,3	189	36,18		<b>143</b>	5,23	109	9,02
<b>49</b>	4,81	131	14,51		<b>144</b>	4,92	157	18,63
<b>50</b>	4,45	180	23,68		<b>145</b>	4,06	133	7,18
<b>51</b>	4,04	229	17,86		<b>146</b>	4,91	169	13,99
<b>52</b>	4,16	366	11,72		<b>147</b>	4,32	70	1,94
<b>53</b>	5,05	202	46,66		<b>148</b>	7,27	266	65,61
<b>54</b>	5,31	190	50,91		<b>149</b>	7,22	200	72,46
<b>55</b>	5,07	115	23,28		<b>150</b>	4,18	43	3,05
<b>56</b>	4,91	162	30,25		<b>151</b>	4,89	120	5,63
<b>57</b>	5,15	260	60,73		<b>152</b>	3,55	345	18,41
<b>58</b>	4,8	262	45,36		<b>153</b>	4,74	135	5,17
<b>59</b>	5,03	228	45,36		<b>154</b>	3,93	95	0,46
<b>60</b>	5,32	251	45,36		<b>155</b>	3,73	106	0,20
<b>61</b>	5,6	257	42,07		<b>156</b>	4,03	90	0,45

<b>62</b>	5,65	210	44,51		<b>157</b>	4,45	102	0,74
<b>63</b>	4,78	172	33,87		<b>158</b>	4,67	150	10,38
<b>64</b>	5,41	341	70,61		<b>159</b>	4,48	164	8,02
<b>65</b>	4,55	249	18,89		<b>160</b>	4,38	100	1,71
<b>66</b>	4,36	270	24,83		<b>161</b>	4,47	88	0,48
<b>67</b>	4,4	192	18,19		<b>162</b>	4,72	120	2,45
<b>68</b>	5,18	250	40,13		<b>163</b>	4,35	166	5,32
<b>69</b>	3,81	249	12,60		<b>164</b>	4,13	118	1,52
<b>70</b>	4,05	243	20,37		<b>165</b>	4,91	136	4,31
<b>71</b>	7,61	319	103,88		<b>166</b>	5,55	127	12,69
<b>72</b>	7,61	320	100,04		<b>167</b>	4,65	104	9,00
<b>73</b>	7,45	299	97,26		<b>168</b>	3,73	195	1,71
<b>74</b>	7,19	480	74,92		<b>169</b>	3,96	150	2,92
<b>75</b>	4,5	176	13,62		<b>170</b>	4,77	113	3,92
<b>76</b>	3,81	112	6,80		<b>171</b>	4,16	114	0,34
<b>77</b>	4,13	190	14,99		<b>172</b>	4,57	115	4,57
<b>78</b>	3,91	164	7,35		<b>173</b>	4,3	195	5,17
<b>79</b>	3,94	168	9,17		<b>174</b>	4,08	116	0,52
<b>80</b>	5,02	100	8,17		<b>175</b>	3,99	129	0,60
<b>81</b>	3,84	136	4,29		<b>176</b>	4,31	101	2,21
<b>82</b>	4,41	268	31,48		<b>177</b>	3,95	164	5,48
<b>83</b>	4,78	448	53,48		<b>178</b>	4,32	136	7,80
<b>84</b>	5,58	264	24,74		<b>179</b>	3,77	229	1,55
<b>85</b>	4,42	268	30,29		<b>180</b>	4,26	188	8,10
<b>86</b>	5,72	381	78,96		<b>181</b>	3,96	137	0,88
<b>87</b>	4,63	178	16,67		<b>182</b>	4,51	160	8,83
<b>88</b>	5,51	334	32,09		<b>183</b>	5,7	139	11,42
<b>89</b>	4,28	220	18,89		<b>184</b>	5,89	176	13,96
<b>90</b>	5,07	238	24,51		<b>185</b>	3,78	169	0,72
<b>91</b>	5,25	198	21,62		<b>186</b>	5,96	97	16,26
<b>92</b>	5,61	140	18,00		<b>187</b>	6,86	130	29,40
<b>93</b>	5,25	250	25,96		<b>188</b>	6,77	130	22,72
<b>94</b>	4,96	278	40,44		<b>189</b>	5,77	108	3,96
<b>95</b>	4,43	266	35,00		<b>190</b>	5,79	121	1,91

### 2.3.2 Spektrofotometrické měření DNA

Extrahované vzorky DNA z ektomykorhiz byly podrobeny měření absorbance světla v UV oblasti. Bylo využito intenzivní absorpce DNA v okolí vlnové délky 260 nm. Takto jsem kontroloval úspěšnost extrakce DNA a její kvalitu (přítomnost kontaminujících látek, která se projevuje intenzivní absorpcí v okolí vlnových délek 230 a 280 nm) u všech vzorků. Příklad měření absorbance je uveden na (obr. 6).

Z obrázku č. 6 je patrné, že koncentrace DNA u vzorku č. 96 činí 212,4 ng/μl, což ukazuje, že extrakce DNA byla úspěšná. Absence významných absorpčních maxim v blízkosti 230 a 280 nm ukazuje, že se podařilo získat vzorek poměrně čistý s nízkou koncentrací kontaminujících látek. Podobných výsledků bylo dosaženo u ostatních vzorků, které se však lišily koncentrací DNA i množstvím nečistot.



Obr. 6. Příklad měření koncentrace DNA (výsledek získaný u vzorku č. 96 pořízený při spektrofotometrickém měření DNA).

Tabulka 3 ukazuje koncentrace DNA v získaných vzorcích. Tato koncentrace se pohybovala v rozmezí 67,2 až 354,2 ng/μl. To znamená, že ani v jednom případě extrakce DNA neselhala a všechny vzorky mohly být podrobeny testu přítomnosti lanůžů.

Tab. 3. Výsledek spektrofotometrického měření koncentrace DNA ve vzorcích.

Číslo vzorku DNA	Měřený objem vzorku v $\mu\text{l}$	Koncentrace DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	Číslo vzorku DNA	Měřený objem vzorku v $\mu\text{l}$	Koncentrace DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )
1	1,5	203,4	96	1,5	212,4
2	1,5	120,3	97	1,5	273,7
3	1,5	90,6	98	1,5	122,5
4	1,5	226,1	99	1,5	84,1
5	1,5	143,5	100	1,5	227,2
6	1,5	149,1	101	1,5	354,2
7	1,5	102	102	1,5	172,6
8	1,5	138,9	103	1,5	173,6
9	1,5	208,2	104	1,5	211,1
10	1,5	193,4	105	1,5	285,1
11	1,5	189,3	106	1,5	168,8
12	1,5	172,3	107	1,5	233
13	1,5	164	108	1,5	212,5
14	1,5	91,1	109	1,5	334,9
15	1,5	210,1	110	1,5	178,5
16	1,5	191,9	111	1,5	95,4
17	1,5	70,4	112	1,5	107,2
18	1,5	140,8	113	1,5	179,3
19	1,5	111,8	114	1,5	287,2
20	1,5	193,4	115	1,5	189,5
21	1,5	125,4	116	1,5	127,5
22	1,5	161,4	117	1,5	145,6
23	1,5	192,4	118	1,5	134,4
24	1,5	212,2	119	1,5	228,2
25	1,5	120,3	120	1,5	153,3
26	1,5	107,5	121	1,5	100,2
27	1,5	67,2	122	1,5	217,1
28	1,5	158,1	123	1,5	271,2
29	1,5	150,2	124	1,5	105,6
30	1,5	102,1	125	1,5	106,1
31	1,5	152,1	126	1,5	92,2

<b>32</b>	1,5	222,9		<b>127</b>	1,5	81,4
<b>33</b>	1,5	128		<b>128</b>	1,5	153
<b>34</b>	1,5	153,9		<b>129</b>	1,5	276,8
<b>35</b>	1,5	143,3		<b>130</b>	1,5	148,5
<b>36</b>	1,5	126,4		<b>131</b>	1,5	79,4
<b>37</b>	1,5	82,4		<b>132</b>	1,5	159,6
<b>38</b>	1,5	141,5		<b>133</b>	1,5	185,3
<b>39</b>	1,5	177,4		<b>134</b>	1,5	130,8
<b>40</b>	1,5	150,7		<b>135</b>	1,5	121
<b>41</b>	1,5	181,2		<b>136</b>	1,5	129
<b>42</b>	1,5	184,7		<b>137</b>	1,5	196,9
<b>43</b>	1,5	89,7		<b>138</b>	1,5	322,3
<b>44</b>	1,5	339,8		<b>139</b>	1,5	156,4
<b>45</b>	1,5	215,2		<b>140</b>	1,5	115,7
<b>46</b>	1,5	118,3		<b>141</b>	1,5	131,9
<b>47</b>	1,5	142,9		<b>142</b>	1,5	168,6
<b>48</b>	1,5	135		<b>143</b>	1,5	155,4
<b>49</b>	1,5	117,6		<b>144</b>	1,5	161,4
<b>50</b>	1,5	134,8		<b>145</b>	1,5	202,3
<b>51</b>	1,5	187,4		<b>146</b>	1,5	166,2
<b>52</b>	1,5	141,6		<b>147</b>	1,5	139,2
<b>53</b>	1,5	195,1		<b>148</b>	1,5	246,4
<b>54</b>	1,5	95,7		<b>149</b>	1,5	143,5
<b>55</b>	1,5	326,2		<b>150</b>	1,5	152,8
<b>56</b>	1,5	130,9		<b>151</b>	1,5	208,6
<b>57</b>	1,5	182,6		<b>152</b>	1,5	110,9
<b>58</b>	1,5	121,1		<b>153</b>	1,5	116
<b>59</b>	1,5	161,2		<b>154</b>	1,5	204,8
<b>60</b>	1,5	185,7		<b>155</b>	1,5	101,7
<b>61</b>	1,5	193,7		<b>156</b>	1,5	174,7
<b>62</b>	1,5	114,3		<b>157</b>	1,5	175,5
<b>63</b>	1,5	146,8		<b>158</b>	1,5	190,4
<b>64</b>	1,5	183,1		<b>159</b>	1,5	171,5
<b>65</b>	1,5	181,5		<b>160</b>	1,5	143,7
<b>66</b>	1,5	147,4		<b>161</b>	1,5	157,3

<b>67</b>	1,5	247,2		<b>162</b>	1,5	241
<b>68</b>	1,5	201,5		<b>163</b>	1,5	193
<b>69</b>	1,5	163,8		<b>164</b>	1,5	249
<b>70</b>	1,5	125,4		<b>165</b>	1,5	155,3
<b>71</b>	1,5	212,9		<b>166</b>	1,5	202,9
<b>72</b>	1,5	199,9		<b>167</b>	1,5	208,1
<b>73</b>	1,5	204,8		<b>168</b>	1,5	178,7
<b>74</b>	1,5	100,9		<b>169</b>	1,5	217
<b>75</b>	1,5	186,3		<b>170</b>	1,5	166,3
<b>76</b>	1,5	207,5		<b>171</b>	1,5	232
<b>77</b>	1,5	143,6		<b>172</b>	1,5	97,1
<b>78</b>	1,5	230,3		<b>173</b>	1,5	260,2
<b>79</b>	1,5	173,2		<b>174</b>	1,5	196,4
<b>80</b>	1,5	155,8		<b>175</b>	1,5	132,4
<b>81</b>	1,5	218,8		<b>176</b>	1,5	123,4
<b>82</b>	1,5	267,9		<b>177</b>	1,5	174,5
<b>83</b>	1,5	123,4		<b>178</b>	1,5	152,5
<b>84</b>	1,5	173,6		<b>179</b>	1,5	133,7
<b>85</b>	1,5	152,7		<b>180</b>	1,5	220,2
<b>86</b>	1,5	177,7		<b>181</b>	1,5	224,4
<b>87</b>	1,5	133,6		<b>182</b>	1,5	132
<b>88</b>	1,5	252,9		<b>183</b>	1,5	137
<b>89</b>	1,5	137,9		<b>184</b>	1,5	190,5
<b>90</b>	1,5	190,5		<b>185</b>	1,5	278,5
<b>91</b>	1,5	259,2		<b>186</b>	1,5	243,1
<b>92</b>	1,5	148,2		<b>187</b>	1,5	201,4
<b>93</b>	1,5	87,8		<b>188</b>	1,5	141,1
<b>94</b>	1,5	172		<b>189</b>	1,5	281,3
<b>95</b>	1,5	251,4		<b>190</b>	1,5	146,6

### 2.3.3 Trofický potenciál půdních vzorků

Výsledky měření trofického potenciálu jednotlivých půdních vzorků jsou uvedeny v Tabulce 4. kolísají v rozmezí 0,1254 až 0,6359.

U standardního živného roztoku byla provedena sériová ředění (ředění 1:2, 1:9 a 1:29). Průměrná hodnota přírůstku absorbance ředících řad byla vypočtená ze šesti analytických opakování u každé řady a je mírou trofického potenciálu standardního živného roztoku o různých koncentracích (Tab. 5).

Tab. 4. Trofický potenciál odebraných půdních vzorků.

Vzorek č.	Trofický poten.	Vzorek	Trofický poten.	Vzorek č.	Trofický poten.
1	0,1777	64	0,5721	127	0,4958
2	0,2279	65	0,5020	128	0,3415
3	0,2506	66	0,4422	129	0,2446
4	0,3739	67	0,3702	130	0,3564
5	0,2343	68	0,3090	131	0,2492
6	0,2936	69	0,4438	132	0,2225
7	0,1677	70	0,3863	133	0,5426
8	0,2003	71	0,4045	134	0,2687
9	0,2224	72	0,3387	135	0,2604
10	0,3034	73	0,3356	136	0,3598
11	0,1673	74	0,5229	137	0,3140
12	0,2463	75	0,3129	138	0,2807
13	0,2765	76	0,3242	139	0,2931
14	0,2278	77	0,3381	140	0,3219
15	0,1903	78	0,3371	141	0,5726
16	0,2091	79	0,3583	142	0,3738
17	0,3406	80	0,2637	143	0,2868
18	0,2539	81	0,2546	144	0,3195
19	0,4310	82	0,4803	145	0,3596
20	0,3096	83	0,4937	146	0,4163
21	0,2815	84	0,3325	147	0,2135
22	0,1868	85	0,5722	148	0,3058
23	0,1846	86	0,4942	149	0,3641

<b>24</b>	0,2803		<b>87</b>	0,3516		<b>150</b>	0,2001
<b>25</b>	0,2154		<b>88</b>	0,5080		<b>151</b>	0,2531
<b>26</b>	0,1937		<b>89</b>	0,4117		<b>152</b>	0,4545
<b>27</b>	0,2481		<b>90</b>	0,5062		<b>153</b>	0,2000
<b>28</b>	0,6359		<b>91</b>	0,2560		<b>154</b>	0,1254
<b>29</b>	0,2509		<b>92</b>	0,2288		<b>155</b>	0,1786
<b>30</b>	0,2619		<b>93</b>	0,2262		<b>156</b>	0,2076
<b>31</b>	0,3564		<b>94</b>	0,1904		<b>157</b>	0,2052
<b>32</b>	0,4387		<b>95</b>	0,2883		<b>158</b>	0,3111
<b>33</b>	0,4179		<b>96</b>	0,3113		<b>159</b>	0,2795
<b>34</b>	0,2123		<b>97</b>	0,3625		<b>160</b>	0,1989
<b>35</b>	0,3218		<b>98</b>	0,2432		<b>161</b>	0,1952
<b>36</b>	0,2117		<b>99</b>	0,3200		<b>162</b>	0,1845
<b>37</b>	0,4387		<b>100</b>	0,2043		<b>163</b>	0,2978
<b>38</b>	0,3761		<b>101</b>	0,2755		<b>164</b>	0,2382
<b>39</b>	0,2770		<b>102</b>	0,3048		<b>165</b>	0,2155
<b>40</b>	0,2101		<b>103</b>	0,2749		<b>166</b>	0,3048
<b>41</b>	0,5318		<b>104</b>	0,5017		<b>167</b>	0,2438
<b>42</b>	0,3581		<b>105</b>	0,4353		<b>168</b>	0,2861
<b>43</b>	0,3085		<b>106</b>	0,2713		<b>169</b>	0,3357
<b>44</b>	0,3122		<b>107</b>	0,4674		<b>170</b>	0,2155
<b>45</b>	0,2459		<b>108</b>	0,4109		<b>171</b>	0,2371
<b>46</b>	0,1942		<b>109</b>	0,2527		<b>172</b>	0,2064
<b>47</b>	0,2384		<b>110</b>	0,3234		<b>173</b>	0,2921
<b>48</b>	0,2883		<b>111</b>	0,2809		<b>174</b>	0,2459
<b>49</b>	0,2206		<b>112</b>	0,2092		<b>175</b>	0,2181
<b>50</b>	0,2705		<b>113</b>	0,2505		<b>176</b>	0,2629
<b>51</b>	0,3219		<b>114</b>	0,2454		<b>177</b>	0,2919
<b>52</b>	0,5635		<b>115</b>	0,2375		<b>178</b>	0,3153
<b>53</b>	0,3117		<b>116</b>	0,5319		<b>179</b>	0,3029
<b>54</b>	0,3493		<b>117</b>	0,5648		<b>180</b>	0,2574
<b>55</b>	0,2790		<b>118</b>	0,3270		<b>181</b>	0,2039
<b>56</b>	0,2031		<b>119</b>	0,3857		<b>182</b>	0,3237
<b>57</b>	0,4030		<b>120</b>	0,4042		<b>183</b>	0,2144
<b>58</b>	0,2994		<b>121</b>	0,5150		<b>184</b>	0,3103



<b>59</b>	0,2480		<b>122</b>	0,2552		<b>185</b>	0,2486
<b>60</b>	0,2934		<b>123</b>	0,4434		<b>186</b>	0,3008
<b>61</b>	0,5007		<b>124</b>	0,2532		<b>187</b>	0,3743
<b>62</b>	0,2115		<b>125</b>	0,4961		<b>188</b>	0,2916
<b>63</b>	0,2325		<b>126</b>	0,2625		<b>189</b>	0,1910
						<b>190</b>	0,1287

Tab. 5. Absorbance nárůstu *Chlorella kessleri* v ředěném standardním živném roztoku o různých koncentracích.

Ředění	Průměrný přírůstek absorbance pro vzorky 1 až 150	Průměrný přírůstek absorbance pro vzorky 151 až 190
1:2	0,1503	0, 2585
1:9	0,0833	0,0749
1:29	0,0669	0,0371

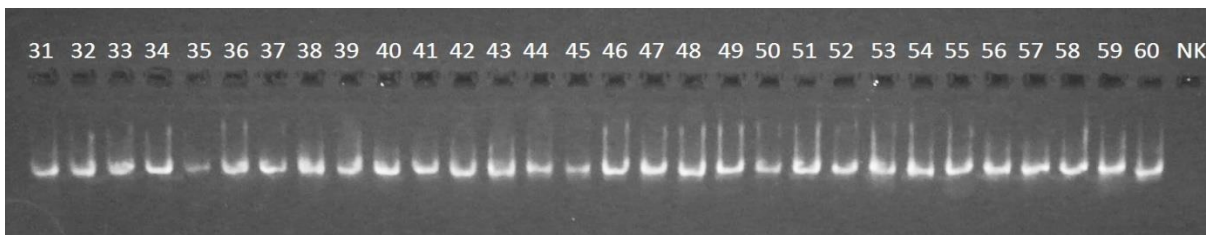
### 2.3.4 Elektroforetické ověření PCR I

Obrázky č. 7, 8 jsou příkladem produktů amplifikovaných pomocí primerů bt2a a bt2b. Obrázek č. 9 je příklad produktů amplifikovaných pomocí primerů NS11 a NLB4. Vzorky označené písmenem NK jsou negativní kontroly. Vzorek označený PK na obr. 9 je pozitivní kontrola obsahující DNA druhu *Tuber aestivum*.

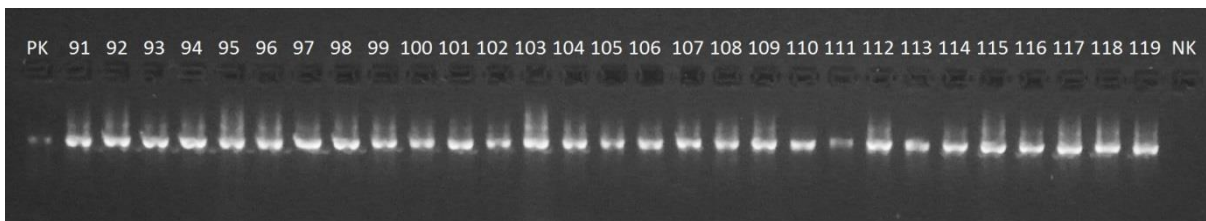
Obrázky 7, 8, 9 ukazují, že ve všech případech byl výsledek amplifikace pozitivní. Výsledek amplifikace negativních kontrol bez templátové DNA je negativní. To ukazuje, že nedošlo ke kontaminaci použitých chemikálií.



Obr. 7. Výsledek elektroforézy PCR I s primery bt2a, bt2b.



Obr. 8. Výsledek elektroforézy PCR I s primery bt2a, bt2b.



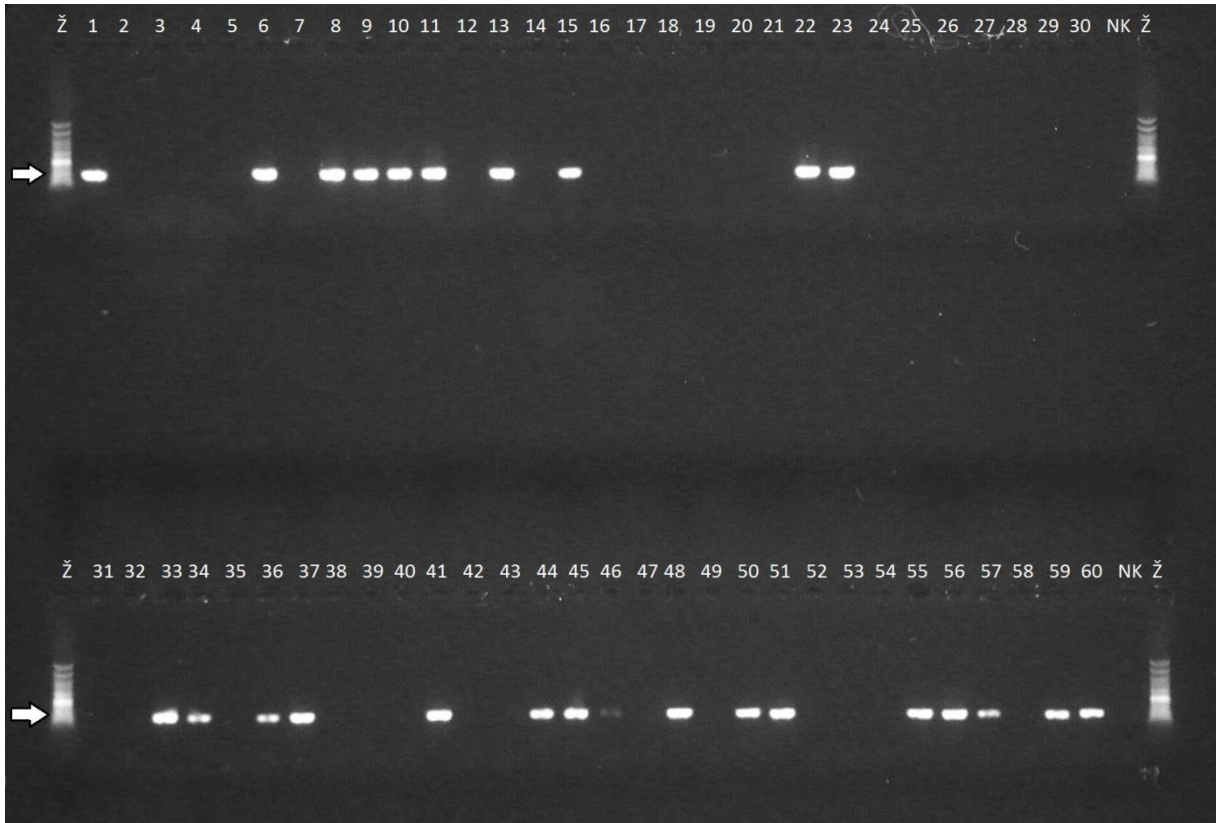
Obr. 9. Výsledek elektroforézy PCR I s primery NSI1 a NLB4.

### 2.3.5 Elektroforetické ověření PCR II - detekce zástupců rodu *Tuber*

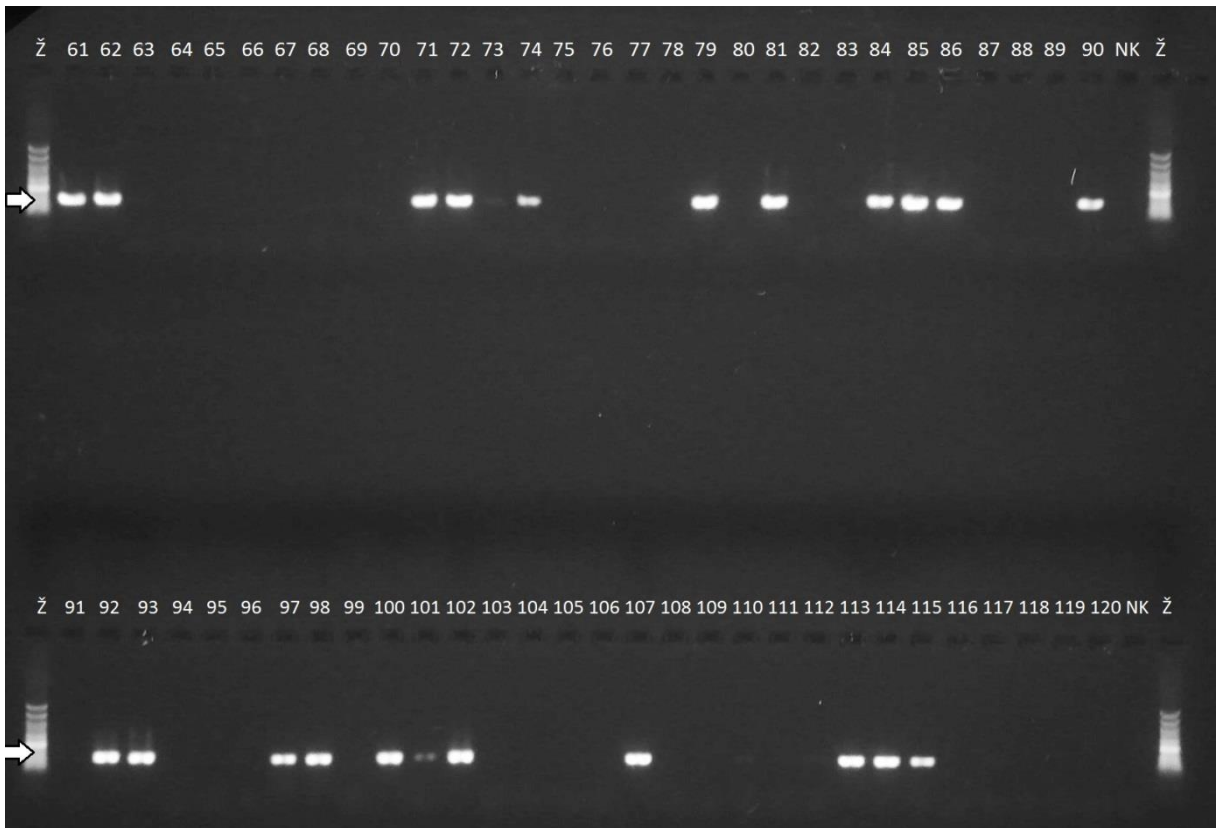
Z obrázků 10, 11, 12, 13 je patrné, že u některých vzorků jsou pozitivní signály amplifikace, což znamená, že z celkového počtu 190 vzorků byly zaznamenány pozitivní signály amplifikace pro rod *Tuber* u 77 vzorků. Srovnáním se standardem, bylo zjištěno, že amplifikované fragmenty mely očekávanou velikost cca 350 bp (párů bází, čili nukleotidů). Tato očekávaná velikost byla zjištěna v práci Zampieriho et al. (2009), v níž byly publikovány primery tubtubf a elytubr.

Pozitivními vzorky byly: vzorek č. 1, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 22, 23, 33, 34, 36, 37, 41, 44, 45, 46, 48, 50, 51, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 71, 72, 74, 79, 81, 84, 85, 90, 92, 93, 97, 98, 100, 101, 102, 107, 113, 114, 115, 122, 123, 124, 126, 128, 129, 130, 135, 136, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 147, 151, 153, 156, 158, 159, 166, 167, 177, 178, 183, 186, 187, 188, 190.

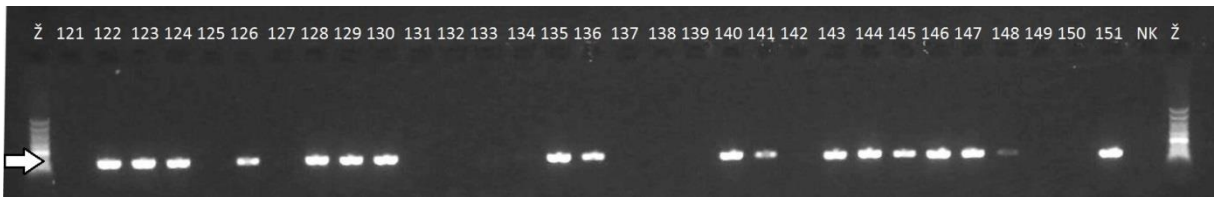
Výsledek amplifikace negativních kontrol bez templátové DNA je negativní. To ukazuje, že nedošlo ke kontaminaci použitých chemikálií v průběhu všech běhů PCR.



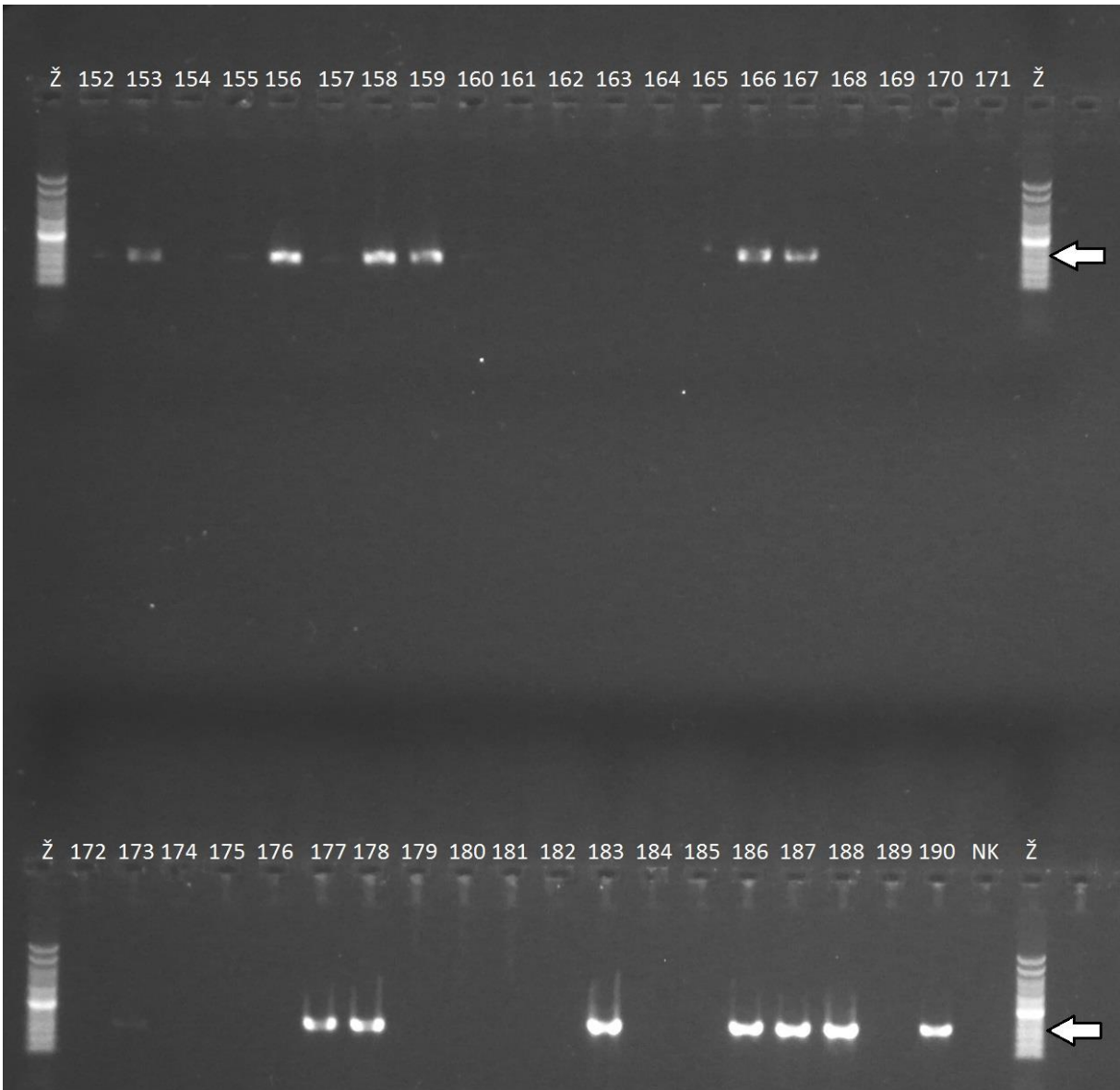
Obr. 10.



Obr. 11.



Obr. 12.



Obr. 13.

Obr. 10, 11, 12, 13. Výsledné obrázky ukazující pozitivní vzorky pro rod *Tuber* (PCR II s primery tubtubf a elytubr, šípkami označené fragmenty mají délku 350 bp., velikostní standard: DNA marker 200–1500+ col.).

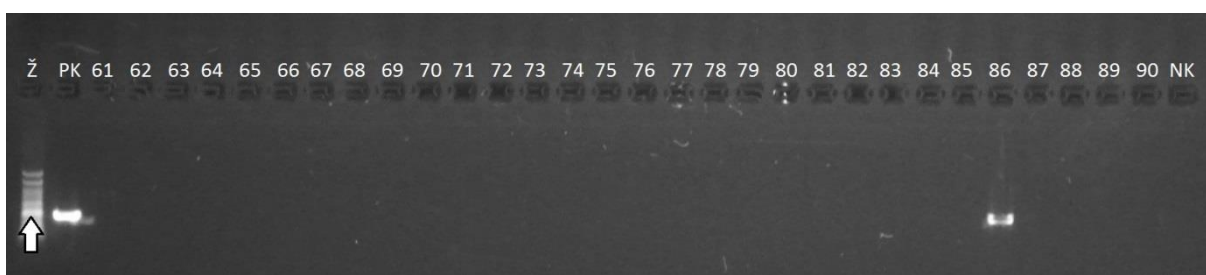
### 2.3.6 Elektroforetické ověření PCR II - detekce druhu *Tuber aestivum*

Z obrázku č. 14 je patrné, že se u pozitivní kontroly (PK) a u vzorku č. 86 amplifikoval fragment o velikosti 500 bp. Tato očekávaná velikost byla zjištěna v práci Gryndlera et al. (2011), v níž byly publikovány primery Tu1sekvF a Tu2sekvR. To znamená, že u pozitivní kontroly (PK) a u vzorku č. 86 byl přítomen druh *Tuber aestivum*.

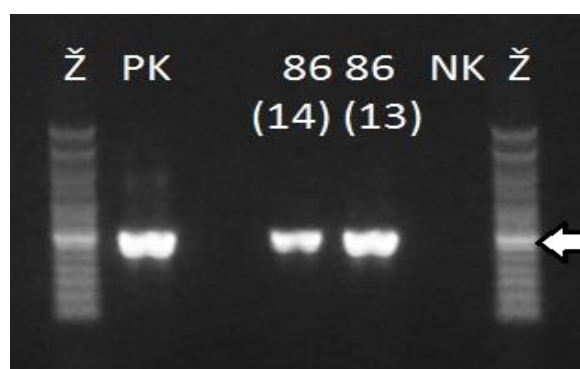
Pro ověření, zda byl skutečně vzorek č. 86 (odebraný v roce 2013, na obrázku č. 15 označen jako vzorek 86 (13)) pozitivní pro druh *Tuber aestivum* a nešlo pouze o kontaminaci, byl v roce 2014 odebrán na stejné lokalitě a na stejném místě vzorek ektomykorhiz, který byl označen jako vzorek č. 86 (14). Tento opakovaně odebraný vzorek sloužil k potvrzení výskytu *Tuber aestivum* na příslušné lokalitě.

Z obrázku č. 15 je patrné, že vzorek č. 86 (14) byl také pozitivní pro druh *Tuber aestivum*, což znamená, že na příslušné lokalitě je přítomen druh *Tuber aestivum*.

Výsledek amplifikace negativních kontrol (NK) bez templátové DNA je negativní, což znamená, že nedošlo ke kontaminaci použitých chemikálií. V případě pozitivních kontrol (PK) je výsledek amplifikace pozitivní, což znamená, že PCR proběhla úspěšně.



Obr. 14.



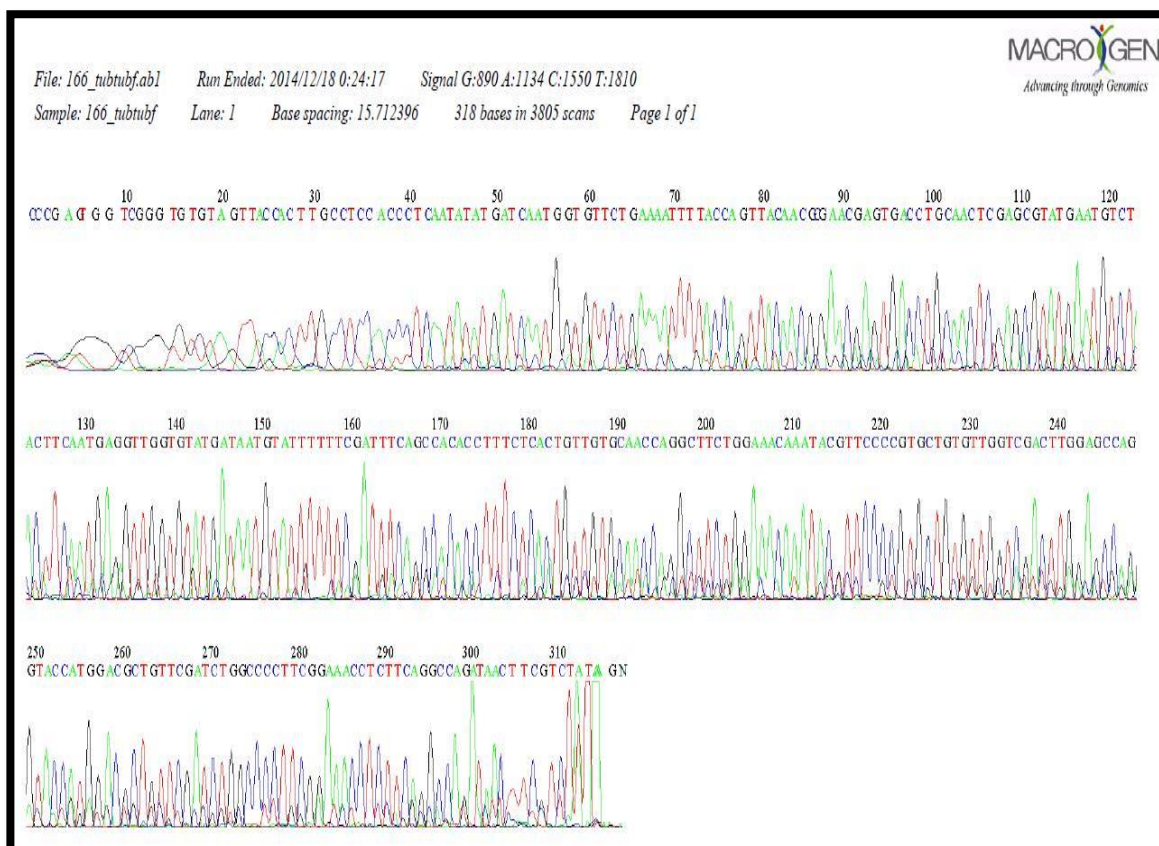
Obr. 15.

Obr. 14, 15. Výsledné obrázky ukazující přítomnost druhu *Tuber aestivum* ve vzorcích 86 (13), 86 (14) a u pozitivních kontrol (PK). Šipkami označené fragmenty mají očekávanou délku 500 bp., (velikostní standard: DNA marker 200–1500+ col.).

### 2.3.7 Druhá identifikace

Pozitivní vzorky z PCR II, získané díky metodám detekujícím zástupce rodu *Tuber* včetně druhu *Tuber aestivum*, byly poslány na sekvenaci do sekvenačního servisního střediska „Macrogen“, Seoul, Korea.

Zde zobrazený obrázek (Obr. 16) je příkladem výsledku sekvenace vzorku 166, který byl dále upravován (editován) v programu „Bioedit“.



Obr. 16. Příklad výsledku sekvenace vzorku 166 (primery tubtubf a elytubr) před editací.

Porovnáním editovaných sekvencí 79 vzorků pomocí genetické databáze GenBank s použitím vyhledávacího nástroje „BLAST“, byla nalezena shoda v 71 případech s publikovanými sekvencemi genu pro beta-tubulin, ve dvou případech byla nalezena shoda s publikovanými sekvencemi druhu *Tuber aestivum* a v 6 případech šlo o nečitelné sekvence.

Po porovnání byla sestavena tabulka (Tab. 6), která ukazuje přehled mým sekvencím nejbližších sekvencí dostupných v databázi GenBank, patřících zástupcům rodu *Tuber*

včetně sekvencí patřících druhu *Tuber aestivum*. Následně byl vytvořen obr. 17, na kterém jsou vyznačeny pozitivní lokality výskytu zástupců rodu *Tuber* a druhu *Tuber aestivum*.

Tab. 6. Přehled sekvencí databáze Genbank nejvíce podobných sekvencím, které byly zjištěny ve vzorcích pomocí amplifikace PCR specifickou pro rod *Tuber* (ve dvou případech pro druh *Tuber aestivum*).

Vzorek č.	Nejbližší nalezená sekvence	Query coverage	E value	Max Ident	Hostitelská rostlina	Druh
1	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$3 \times 10^{-127}$	96%	Buk lesní	<i>Tuber borchii</i>
6	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$4 \times 10^{-115}$	99%	Habr obecný	<i>Tuber rufum</i>
8	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$4 \times 10^{-115}$	98%	Buk lesní	<i>Tuber borchii</i>
9	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$7 \times 10^{-118}$	99%	Buk lesní	<i>Tuber foetidum</i>
10	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$6 \times 10^{-124}$	99%	Habr obecný	<i>Tuber foetidum</i>
11	<a href="#">JN392118.1</a>	98%	$4 \times 10^{-120}$	99%	Habr obecný	<i>Tuber rufum</i>
13	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$6 \times 10^{-119}$	99%	Habr obecný	<i>Tuber foetidum</i>
15	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$1 \times 10^{-115}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
22	<a href="#">FN252810.1</a>	97%	$2 \times 10^{-88}$	95%	Lípa	<i>Tuber borchii</i>
23	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$5 \times 10^{-114}$	98%	Habr obecný	<i>Tuber borchii</i>
33	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$2 \times 10^{-118}$	97%	Habr obecný	<i>Tuber borchii</i>
34	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$5 \times 10^{-130}$	97%	Buk lesní	<i>Tuber borchii</i>
36	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$2 \times 10^{-118}$	99%	Buk lesní	<i>Tuber foetidum</i>
37	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$3 \times 10^{-106}$	99%	Lípa	<i>Tuber foetidum</i>
41	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$2 \times 10^{-123}$	99%	Dub	<i>Tuber foetidum</i>
44	<a href="#">FN256291.1</a>	99%	$2 \times 10^{-114}$	98%	Líška obecná	<i>Tuber foetidum</i>
45	<a href="#">FN256291.1</a>	98%	$3 \times 10^{-121}$	98%	Líška obecná	<i>Tuber foetidum</i>
46	<a href="#">JN392114.1</a>	86%	$3 \times 10^{-78}$	88%	Dub	<i>Helvella ephippium</i>
48	<a href="#">FN256291.1</a>	99%	$3 \times 10^{-116}$	98%	Líška obecná	<i>Tuber foetidum</i>
50	<a href="#">FJ560941.1</a>	99%	$2 \times 10^{-113}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
51	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$5 \times 10^{-114}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
55	<a href="#">FJ560940.1</a>	100%	$3 \times 10^{-116}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
56	Nečitelná sekvence	–	–	–	–	–
57	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$6 \times 10^{-119}$	98%	Lípa	<i>Tuber rufum</i>
59	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$7 \times 10^{-113}$	98%	Buk lesní	<i>Tuber borchii</i>

60	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$2 \times 10^{-118}$	98%	Dub	<i>Tuber rufum</i>
61	<a href="#">FJ560940.1</a>	100%	$2 \times 10^{-114}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
62	Nečitelná sekvence	–	–	–	–	–
71	<a href="#">GU979146.1</a>	100%	$3 \times 10^{-101}$	95%	Dub	<i>Tuber huidongense</i>
72	<a href="#">GU979142.1</a>	100%	$4 \times 10^{-110}$	96%	Dub	<i>Tuber umbilicatum</i>
74	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$1 \times 10^{-130}$	97%	Dub	<i>Tuber rufum</i>
79	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$3 \times 10^{-116}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
81	<a href="#">FN252810.1</a>	99%	$3 \times 10^{-116}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
84	Nečitelná sekvence	–	–	–	–	–
85	<a href="#">FJ560941.1</a>	99%	$3 \times 10^{-116}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
90	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$3 \times 10^{-116}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
92	<a href="#">FN252873.1</a>	97%	$4 \times 10^{-100}$	99%	Lípa	Uncultured fungus
93	Nečitelná sekvence	–	–	–	–	–
97	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$2 \times 10^{-123}$	97%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
98	<a href="#">FN256291.1</a>	99%	$1 \times 10^{-115}$	98%	Dub	<i>Tuber foetidum</i>
100	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$3 \times 10^{-106}$	99%	Dub	<i>Tuber foetidum</i>
101	<a href="#">JN392114.1</a>	98%	$5 \times 10^{-95}$	93%	Dub	<i>Helvella ephippium</i>
102	Nečitelná sekvence	–	–	–	–	–
107	<a href="#">FN252811.1</a>	100%	$2 \times 10^{-97}$	99%	Dub	<i>Tuber dryophilum</i>
113	<a href="#">FJ560939.1</a>	100%	$6 \times 10^{-124}$	99%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
114	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$4 \times 10^{-105}$	99%	Lípa	<i>Tuber foetidum</i>
115	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$2 \times 10^{-119}$	99%	Dub	<i>Tuber rufum</i>
122	<a href="#">FN252813.1</a>	100%	$4 \times 10^{-74}$	98%	Dub	<i>Tuber oligospermum</i>
123	<a href="#">FJ560939.1</a>	100%	$2 \times 10^{-103}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
124	<a href="#">FJ560939.1</a>	100%	$1 \times 10^{-125}$	99%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
126	<a href="#">FJ560939.1</a>	100%	$3 \times 10^{-121}$	100%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
128	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$4 \times 10^{-120}$	98%	Dub	<i>Tuber rufum</i>
129	<a href="#">FN252869.1</a>	97%	$9 \times 10^{-117}$	100%	Buk lesní	Uncultured fungus
130	<a href="#">FN256291.1</a>	99%	$1 \times 10^{-115}$	98%	Habr obecný	<i>Tuber foetidum</i>
135	<a href="#">FJ560937.1</a>	100%	$2 \times 10^{-114}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
136	<a href="#">GU979142.1</a>	100%	$1 \times 10^{-111}$	96%	Habr obecný	<i>Tuber umbilicatum</i>
140	<a href="#">FJ560938.1</a>	99%	$9 \times 10^{-122}$	100%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
141	<a href="#">FJ560939.1</a>	100%	$3 \times 10^{-126}$	99%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
143	<a href="#">FJ560939.1</a>	95%	$2 \times 10^{-119}$	94%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
144	<a href="#">JN392118.1</a>	100%	$1 \times 10^{-120}$	99%	Dub	<i>Tuber rufum</i>
145	<a href="#">FJ560939.1</a>	100%	$9 \times 10^{-122}$	100%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
146	<a href="#">FN252810.1</a>	99%	$2 \times 10^{-114}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>



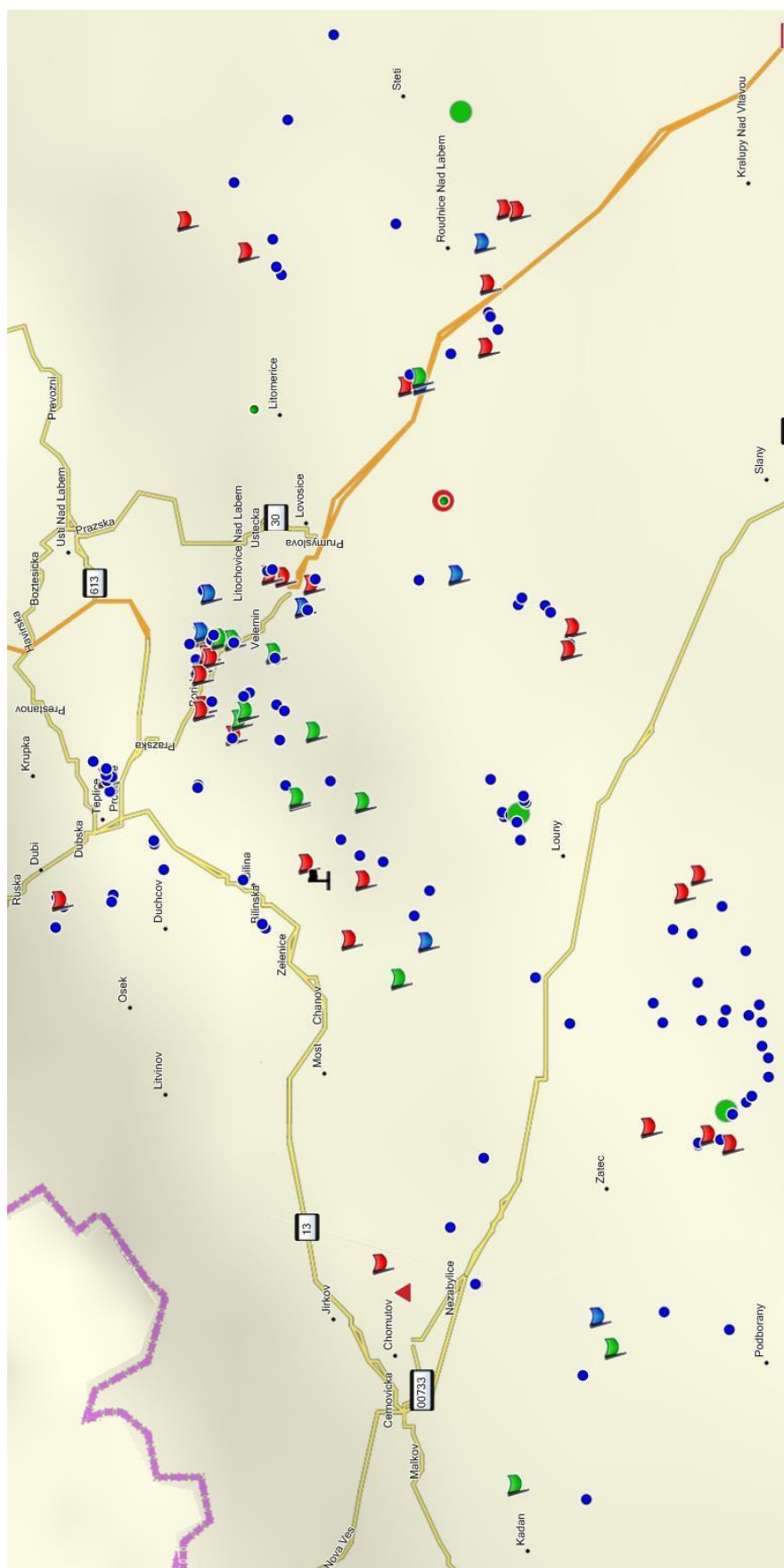
147	<a href="#">FN252811.1</a>	100%	$6 \times 10^{-114}$	98%	Dub	<i>Tuber dryophilum</i>
151	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$1 \times 10^{-115}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
153	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$3 \times 10^{-111}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
156	<a href="#">FJ560942.1</a>	100%	$3 \times 10^{-111}$	98%	Dub	<i>Tuber borchii</i>
158	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$1 \times 10^{-110}$	98%	Habr obecný	<i>Tuber borchii</i>
159	<a href="#">FN252811.1</a>	100%	$7 \times 10^{-50}$	99%	Dub	<i>Tuber dryophilum</i>
166	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$1 \times 10^{-109}$	99%	Lípa	<i>Tuber foetidum</i>
167	<a href="#">JN392114.1</a>	95%	$6 \times 10^{-41}$	93%	Dub	<i>Helvella ephippium</i>
177	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$5 \times 10^{-114}$	98%	Buk lesní	<i>Tuber borchii</i>
178	<a href="#">FN252810.1</a>	100%	$5 \times 10^{-114}$	98%	Buk lesní	<i>Tuber borchii</i>
183	<a href="#">JN392118.1</a>	98%	$5 \times 10^{-36}$	93%	Lípa	<i>Tuber rufum</i>
186	<a href="#">JN392118.1</a>	99%	$6 \times 10^{-124}$	98%	Dub	<i>Tuber rufum</i>
187	<a href="#">FN256291.1</a>	99%	$4 \times 10^{-115}$	98%	Lípa	<i>Tuber foetidum</i>
188	Nečitelná sekvence	–	–	–	–	–
190	<a href="#">FN256291.1</a>	100%	$5 \times 10^{-89}$	94%	Dub	<i>Tuber foetidum</i>
86(13)	<a href="#">HQ706002.1</a>	100%	$1 \times 10^{-166}$	100%	Dub	<i>Tuber aestivum</i>
86(14)	<a href="#">KJ524527.1</a>	100%	$4 \times 10^{-171}$	99%	Dub	<i>Tuber aestivum</i>

Vysvětlení pojmů: **Query coverage** = srovnávaná část sekvence, **E value** = pravděpodobnost, že se daná sekvence v dané databázi vyskytuje náhodně, **Max ident** = procentuální vyjádření shodnosti jednotlivých bazí.

Z celkem 33 vzorků byly získány amplikony části genu pro beta-tubulin, jejichž sekvence se podobá sekvenci téhož úseku genu u druhu *Tuber borchii*, amplikony, jejichž sekvence se podobá sekvenci druhu *Tuber foetidum* byly získány celkem ze 16 vzorků. *Tuber rufum* byl takto detekován v 10 vzorcích, *Tuber dryophilum* ve 3 vzorcích a *Tuber umbilicatum* ve 2 vzorcích. Sekvence získaná ze vzorku č. 71 svědčí o přítomnosti druhu *Tuber huidongense* a sekvence získaná ze vzorku č. 122 byla podobná sekvenci druhu *Tuber oligospermum*. Ve dvou případech se sekvence podobají tzv. „uncultured fungus“ neboli neznámý nekultivovaný druh (Genbank). Sekvence amplikonů ze vzorků 86 (13) a 86 (14) získané z oblasti ITS svědčí o přítomnosti druhu *Tuber aestivum*.

Druhy *Tuber borchii*, *Tuber foetidum* a *Tuber huidongense* byly pravděpodobně detekovány stejnou metodou i na jižní Moravě (Nováková, 2013).

Při porovnání sekvencí se může stát, že se ve výsledku objeví zástupci z jiného rodu (v mém případě šlo o *Helvella ephippium* ve vzorcích č. 46, 101, 167), kteří patří do stejného řádu jako rod *Tuber* (řád: *Pezizales*).



Obr. 17. Vyznačení pozitivních míst pro zástupce rodu *Tuber* (červená vlajka: *T. borchii*, zelená vlajka: *T. foetidum*, modrá vlajka: *T. rufum*, velké zelené kolečko: *T. dryophilum*, malé zelené kolečko: *T. umbilicatum*, červený trojúhelník: *Tuber oligospermum*, velké červené kolečko: *Tuber huijdonense*) a druh *Tuber aestivum* (černá vlajka).

### 2.3.8 Faktory prostředí určující výskyt zástupců rodu *Tuber*

Jedním z cílů mé práce bylo to, že jsem se snažil postihnout faktory prostředí, které by mohly být důležité nebo určující pro výskyt lanýžů.

Provedl jsem mnohorozměrnou redundanční analýzu (RDA) vybraných půdních parametrů a faktorů prostředí pomocí programu Canoco (viz kapitola 2.2.7). Byla také sestavena tabulka (Tab. 7), která ukazuje výsledky redundanční analýzy.

Do analýzy byly zahrnuty buď všechny nejméně 2x nalezené druhy (včetně *T. dryophilum* a *T. umbilicatum*), nebo jen druhy, u kterých byl zaznamenán výskyt více než 5x. V tomto případě šlo o druhy *T. borchii*, *T. foetidum* a *T. rufum*.

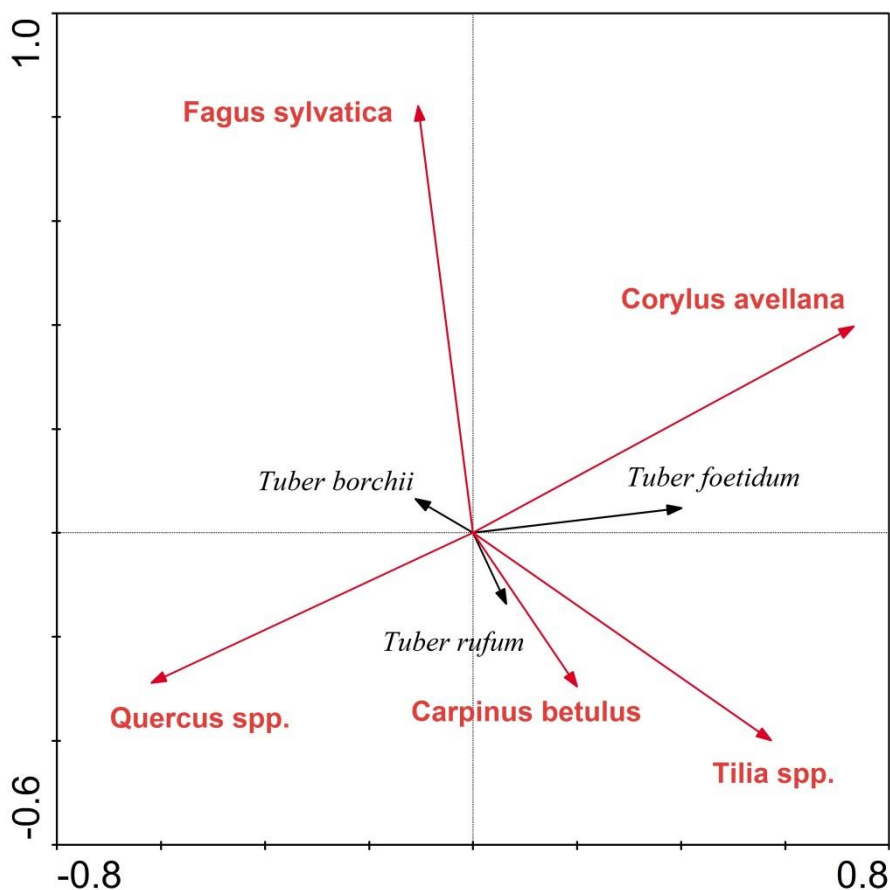
Tab. 7. Testování významnosti vlivů faktorů prostředí na výskyt zachycených druhů rodu *Tuber*.

Faktory prostředí	1. kanonická osa			Všechny kanonické osy		
	eigenvalue	F-ratio	P-value	Trace	F-ratio	P-value
Analýza včetně zřídka zachycených druhů						
hostitelská rostlina	0,047	9,122	0,0060	0,054	2,657	0,0080
vlastnosti půdního vzorku	0,051	9,968	0,0020	0,065	3,191	0,0020
vlastnosti půdního vzorku normaliz.	0,054	10,649	0,0040	0,065	3,219	0,0020
nadmořská výška	–	–	–	0,021	4,064	0,0120
podrost	0,034	6,417	0,0740	0,049	1,560	0,0780
Analýza bez zřídka zachycených druhů (pouze <i>T. borchii</i> , <i>T. foetidum</i> , <i>T. rufum</i> )						
hostitelská rostlina	0,053	10,377	0,0060	0,061	2,993	0,0060
vlastnosti půdního vzorku	0,054	10,649	0,0040	0,065	3,219	0,0020
vlastnosti půdního vzorku normaliz.	0,055	10,725	0,0040	0,067	3,296	0,0020
nadmořská výška	–	–	–	0,021	3,946	0,0180
podrost	0,037	6,986	0,1160	0,053	1,461	0,1160

Proto, že měření nárůstu řasové biomasy na standardním živném roztoku (ředění 1:2) ve 2 různých běžích stanovení trofického potenciálu poskytlo z neznámých důvodů různé výsledky, byla provedena normalizace výsledků vydělením hodnotou absorbance získané na živném roztoku při ředění 1:2. Tato normalizace nezpůsobila podstatně odlišný výsledek RDA, ani výsledek Monte Carlo testu, který je uveden v Tab. 7, řádek "vlastnosti půdního vzorku normaliz.". Vzhledem k tomu, že i příslušný biplot (grafická prezentace) se prakticky nelišil od biplotu získaného s nenormalizovanými výsledky, není v práci prezentován.

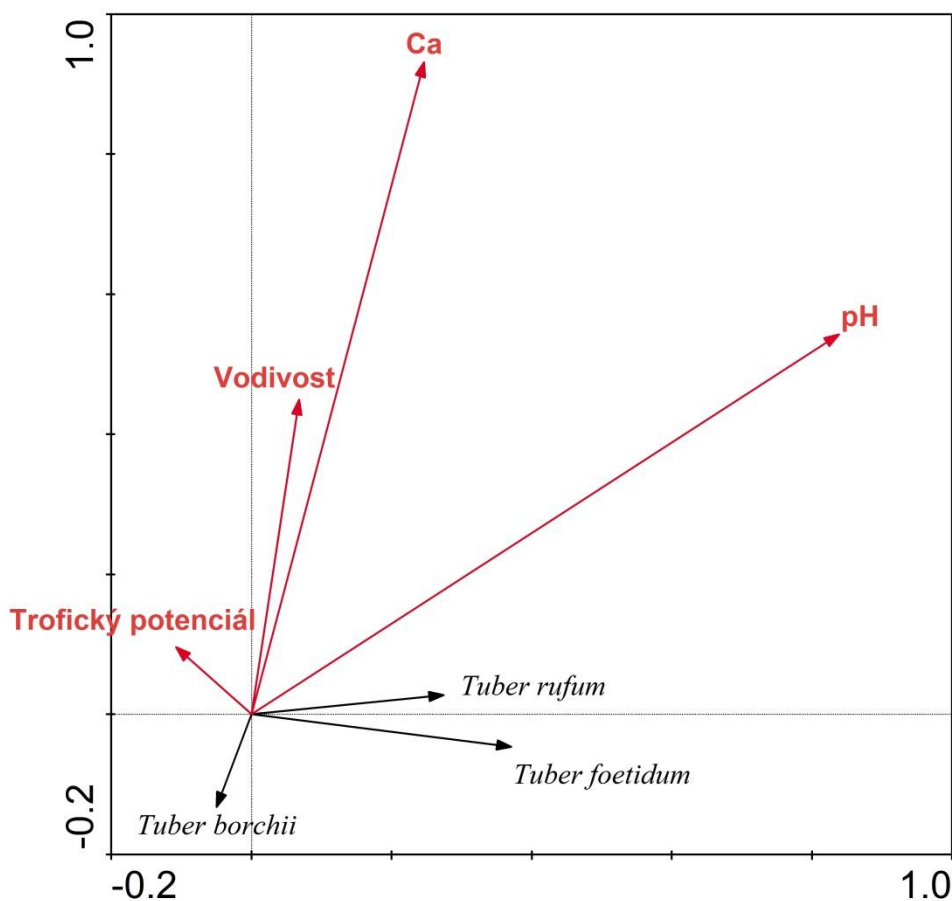
Také zahrnutí druhů, u kterých byl zaznamenán výskyt 2x až 5x, významně nezměnilo výsledky RDA a Monte Carlo testu a ani příslušné biploty se významně nelišily. Proto jsou v práci zařazeny pouze biploty, které vycházejí z analýzy tří nejčastěji zachycených druhů s vyloučením *T. dryophilum* a *T. umbilicatum*.

Obrázek č. 18 (vysvětlující 5,3% variability) ukazuje, že *T. foetidum* má tendenci obsazovat místa, kde se vyskytuje líska, *T. rufum* má slabou tendenci obsazovat místa s výskytem habru a lípy. V případě druhu *T. borchii* nebyla zaznamenána pozitivní korelace, což znamená, že nepreferuje určitý druh hostitelské rostliny.



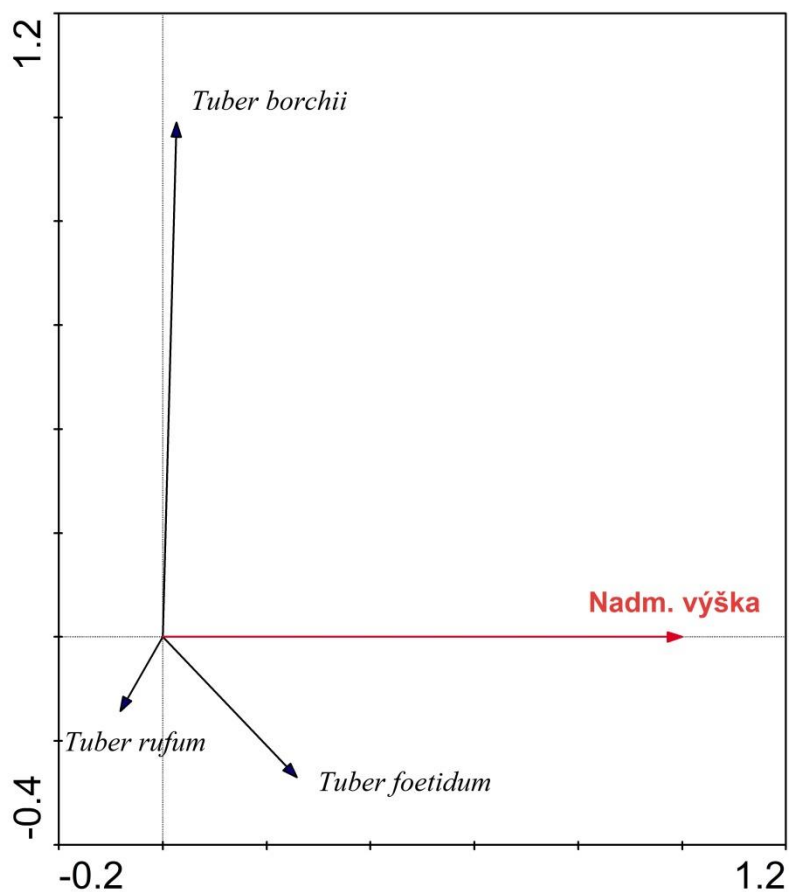
Obr. 18. Vztah mezi výskytem zachycených druhů rodu *Tuber* a výskytem potenciálních hostitelských rostlin, jimiž jsou dub, buk, líska, habr a lípa (biplot redundanční analýzy).

Z obrázku č. 19 (vysvětlující 5,4% variability) je patrné, že *T. foetidum* a *T. rufum* slabě negativně korelují s trofickým potenciálem a *T. borchii* velmi slabě negativně koreluje s Ca a vodivostí půdního výluhu, což vede k závěru, že v tomto případě Ca, pH, vodivost a trofický potenciál nemají zásadní vliv na výskyt identifikovaných druhů.



Obr. 19. Korelace faktorů prostředí (pH, Ca, vodivost a trofický potenciál) s výskytem zachycených druhů rodu *Tuber*.

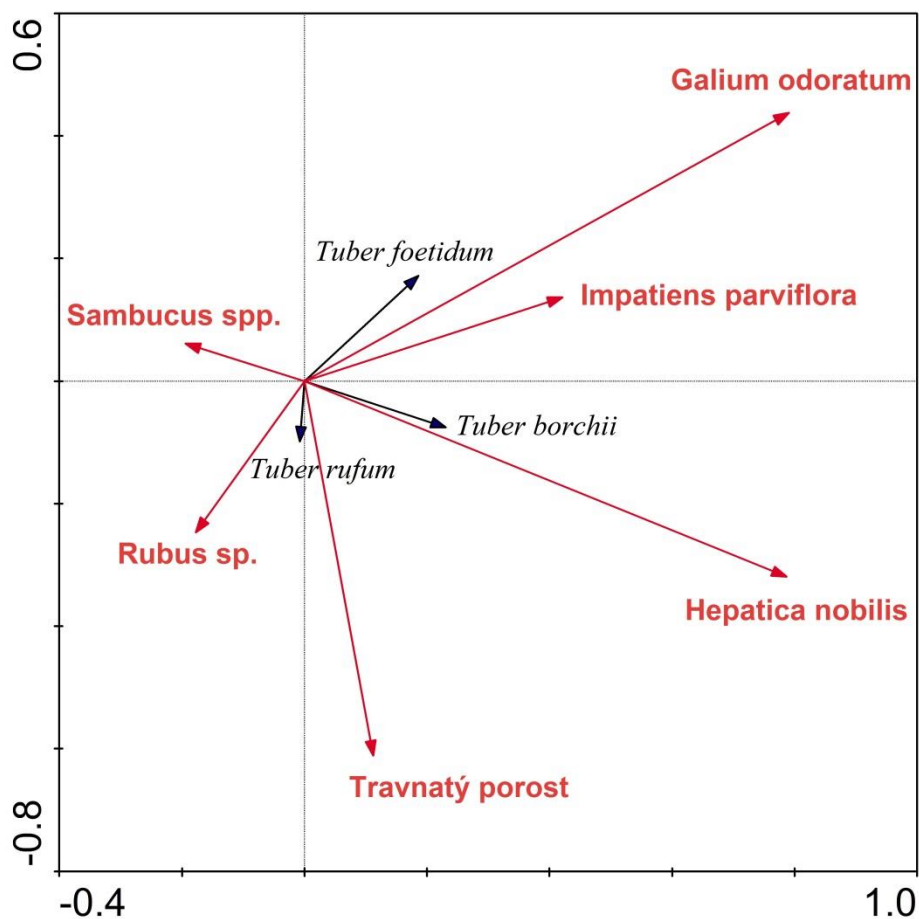
Na obrázku č. 20 (vysvětlující jen 2% variability) je vidět, že *T. foetidum* má jen nepatrnou tendenci se vyskytovat ve vyšších nadmořských výškách. V případě *T. borchii*, *T. rufum* nadmořská výška nehraje roli.



Obr. 20. Korelace nadmořské výšky lokality a výskytu zachycených druhů rodu *Tuber*.



Obrázek č. 21 znázorňuje vztah mezi vegetací v okolí hostitelské rostliny a zachycenými druhy rodu *Tuber*. Obrázek (vysvětlující kolem 4% variability) ukazuje velmi slabou vazbu hub na podrost. *T. borchii* se častěji vyskytoval v přítomnosti *Hepatica nobilis* a *T. foetidum* pozitivně koreluje s *Galium odoratum* a *Impatiens parviflora*.

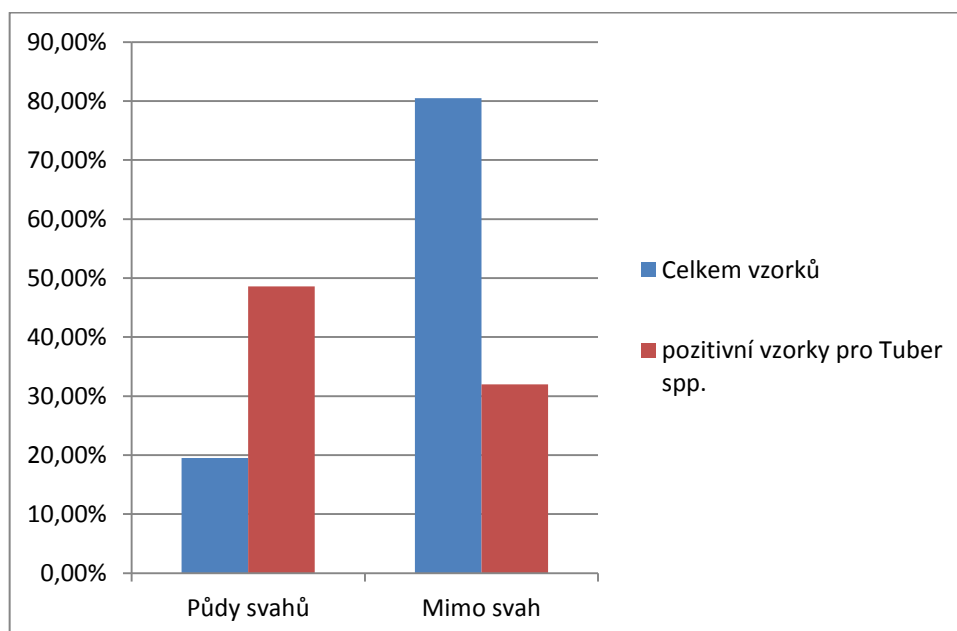


Obr. 21. Vazba zachycených druhů rodu *Tuber* na vegetaci podrostu v okolí hostitelské rostliny.

### 2.3.9 Výskyt lanýžů v půdách svahů

V této kapitole se zabývám dalším cílem práce. Tímto cílem bylo zjistit, zda se lanýže v zájmovém území vyskytovaly v půdách svahů. Ze 190 lokalit bylo odebráno celkem 153 vzorků mimo půdy svahů a 37 vzorků z půd svahů. V mimo svahových půdách jsem zaznamenal lanýže celkem ve 49 případech a v půdách svahů celkem v 18 případech. Výsledky jsou prezentovány na obrázku č. 22.

Nejvíce se v půdách svahů vyskytoval *T. borchii* (celkem 9x), *T. foetidum* (celkem 6x.) a nepatrné procento zaujímal *T. rufum*, *T. dryophilum* a *T. aestivum*.



Obr. 22. Procentuální zastoupení lanýžů v půdách svahů a jeho srovnání se zastoupením v půdách mimo svah.

## 2.4 Popis vybraných druhů identifikovaných jako nejpodobnější s nositeli mnou získaných sekvencí genu pro beta tubulin

### *Tuber borchii* Vittad. – lanýž Borchiiův

Askokarp (plodnice) má nepravidelnou formu je hladký a vypouklý. Dosahuje velikosti 2–3 (7) cm, zpočátku je bělavý a postupem času zhnědne a často se na něm objevují načervenalá místa. Peridium (vnější stěna plodnice) je silné 150–200  $\mu\text{m}$ , bělavé, pseudoparenchymatické, složené z polygonálních buněk a u mladých jedinců je hustě pokryté chlupy. Chloupky jsou 40–70  $\mu\text{m}$  dlouhé, napříč měří 4–5  $\mu\text{m}$ , jsou zúžené a hyalinní. Gleba (vnitřní plodná část plodnice) je pevná, nejprve bělavá, pak zelená nebo červenohnědá a v dospělosti je mramorovaná. Askospory (výtrusy) jsou velké 32–47 x 23–39  $\mu\text{m}$  bez ornamentu, velikost je velice variabilní v závislosti na počtu spor. Askus (vřecko) je široce elipsovité, světle žlutý, při zralosti hnědý až průsvitný a zdobený pravidelnými síťkami s oky, kterých je 4–8 po celé šířce spory a jsou 4–7  $\mu\text{m}$  vysoké, 4–10  $\mu\text{m}$  dlouhé (<http://www.trufamania.com/Tuber%20borchii%20English.htm>).

*Tuber borchii* (obr. 18) se vyznačuje česnekovým zápachem, který je zpočátku příjemný, ale s přibývajícím věkem je moc silný, až nepříjemný. Chuť je velmi silná a příjemná a připomíná česnek. *Tuber borchii* je velice tolerantní k vlastnostem půdy, ale dává přednost dobře odvodněným, písčítým a vápnitým půdám. Většinou ho najdeme na jílových a písčítých půdách spolu s jehličnany nebo listnatými stromy a na vápenitých a kyselých půdách (<http://www.trufamania.com/Tuber%20borchii%20English.htm>).

*T. borchii* má širokou geografickou distribuci v Evropě, od Sicílie až na jih Finska. Byl nalezen v jihovýchodní a jihozápadní Francii a v Itálii. Je vzácný v jihozápadní Anglii, Walesu, v Irsku, v Dánsku a Švýcarsku. Hojněji roste v Polsku (západně od Vratislavi) a v Česku. V Maďarsku, byl zaznamenán v Karpatské kotlině a v západním Německu (Bavorsko, oblast mezi Mnichovem a Dunají). *Tuber borchii* dozrává od konce listopadu do konce dubna (Riousset et al., 2001).



Obr. 23. *Tuber borchii* Vitt. (<http://www.actaplantarum.org/floraitaliae/viewtopic.php?t=46282>).

### ***Tuber rufum*** Pico – lanýž ryšavý

Plodnice jsou kulovité, až hlízovité, 10–30 mm široké a nachází se v půdě pod vrstvou hrabanky. Obal plodnice je světle okrový, okrově oranžový, rezavohnědý až tmavě červenohnědý, hladký až jemně bradavičnatý. Teřich je chrupavčitý, v mládí bělavý až žlutavě šedý, pak šedě až rezavě hnědý, protkaný bělavými žilkami. Výtrusy mají velikost 24–35 x 15–21  $\mu\text{m}$ . Jsou elipsoidní, na jednom konci často špičaté, pokryté štíhlými, 2–3  $\mu\text{m}$  dlouhými ostny (Holec et al., 2012).

*T. rufum* je velmi běžný v Evropě, kde roste v symbiotickém spojení s mnoha listnatými i jehličnatými stromy (Iotti et al., 2007). Ve Francii, obsazuje stejná stanoviště jako *T. melanosporum*, *T. brumale*, *T. aestivum*, *T. uncinatum* a *T. mesentericum* (Riousset et al., 2001). Přestože se vyskytuje s cennými druhy, je považován za druh nevalné chuti a bez komerční hodnoty (Iotti et al., 2007). Ve Středomoří, roste velmi často s duby. V Burgundsku, v blízkosti Dijonu, *T. rufum* roste na vápencových plošinách, kde jsou plantáže borovice černé. Najdeme ho také v Anglii, Walesu, Irsku, kde roste s duby, buky, kaštany, břízami, borovicemi, smrky, modřínů a cedry. *T. rufum* se vyskytuje i v Německu (Anhalt, Hanover, Cassel, Schwarzburg), Švýcarsku, Dánsku, Maďarsku pod duby a borovicemi. V Maroku byl *T. rufum* zaznamenán ve výšce 2000 metrů nad mořem. Pokud se zaznamená přítomnost *T. rufum* v lanýžových plantážích, znamená to, že jsou už stromy staré, a že klesá produkce plodnic ekonomicky významnými druhy lanýžů. *T. rufum* se vyvíjí po většinu roku, ale doba zralosti je na podzim a v zimě (Riousset et al., 2001).



Obr. 24. *Tuber rufum* Pico (<http://www.asturnatura.com/fotografia/setas-hongos/tuber-rufum-forma-rufum-pico-fr-1/4288.html>).

### *T. foetidum* Vittad.

Plodnice jsou spíše měkké, kulovité, popraskané s esovitými šterbinami, 3–6 cm široké. Obal plodnice je načervenalý, zrnitý s malými bradavičkami. Vnitřek plodnice je červenohnědý, protkaný nepravidelnými bělavými až načervenalými hnědými žilkami. Vůně je česneková, připomínající žluklý olej a acetylen. Chuť připomíná žluklý olej. Vřečka jsou přisedlá, velikost 70–90 x 62–75  $\mu\text{m}$ . Výtrusy mají velikost 24–45 x 15–32  $\mu\text{m}$ . Jsou elipsoidní, žluto hnědé, červenohnědé, nahnědlé, 1 až 5 spor ve vřecku (obvykle 3 nebo 4).

*T. foetidum* je velmi vzácný. Ve Francii, byl nalezen pod borovicemi v okolí Mont-de-Marsan v roce 1998. Byl také zaznamenán v Itálii, kde roste ve smíšených lesích nejčastěji s buky a lípami. Je vzácný v Dánsku a také v Británii, kde byl nalezen pod modřínem. *Tuber foetidum* dozrává od listopadu do ledna (Riousset et al., 2001).



Obr. 25. *T. foetidum* Vittad., převzato od Riousseta et al. (2001).

## DISKUSE

Práce byla vedena snahou přispět k poznání rozšíření lanýže na našem území. Za tímto účelem byla aplikována metoda, která se na našem území používá (Zampieri et al., 2009; Gryndler et al., 2011). Tím, že jsem tuto metodu použil, jsem se podílel na její zavádění do praxe.

Jde o metodu, díky které můžeme detekovat zástupce rodu *Tuber* a lanýže letního v mykorhizních kořenech. Metoda byla použita, protože dnes jiným způsobem výskyt lanýžů není možné zjistit, aniž by bylo třeba najít plodnice. Jde o molekulárně genetickou metodu využívající polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Metoda je poměrně levná a rychlá, ale vyžaduje velkou řadu nákladných technických zařízení a zejména čisté prostory.

Frekvence detekce lanýžů doporučenými metodickými prostředky v zájmovém území byla vyšší, než jsem očekával. Výskyt zástupců rodu *Tuber* je rozšířen v mnoha půdách s různými vlastnostmi. Zástupci rodu *Tuber* byli zjištěni v 67 případech z celkového počtu 190 vzorků (viz tabulka 6).

Nicméně díky výsledkům, kterých bylo dosaženo při detekci lanýžů pomocí specifických primerů (tubtubf a elytubr) pro rod *Tuber* v odebraných vzorcích ektomykorhiz, mohu říci a zároveň potvrdit, že zde použitá metoda, která byla publikována v práci od Zampieriho et al. (2009), je vhodná pro studium výskytu zástupců rodu *Tuber* spp.

Přestože je metoda PCR se specifickými primery velmi spolehlivá a široce používaná (Zampieri et al., 2009; Gryndler et al., 2011), nelze ji však aplikovat nekriticky. Mohou se totiž projevit některé její nedostatky. V mém případě se projevila nedostatečná specifická metoda tím, že kromě zástupců rodu *Tuber* byla detekována i *Helvella* sp.. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že rod *Helvella* je taxonomicky blízký rodu *Tuber* (oba jsou zástupci řádu *Pezizales*), že odpovídající sekvenční motivy rozpoznávané specifickými primery se u obou rodů podobají. Specifická primerů pro určitý rod (v mém případě rod *Tuber*) nemusí být proto stoprocentní (osobní komunikace Gryndler M.).

Aby byly výsledky analýzy vzorků pomocí PCR se specifickými primery rozpoznávacími oblast genu pro beta-tubulin zástupců rodu *Tuber* naprosto spolehlivé, nelze se spolehnout pouze na výsledek PCR a je třeba produkt PCR sekvenovat a identitu nositele sekvence potvrdit srovnáním se známými sekvencemi náležejícími detekovanému druhu.

Dalším problémem je nedostatečná citlivost PCR s primery specifickými pro rod *Tuber* ke druhu *Tuber aestivum*. Proto bylo nutno k detekci *T. aestivum* použít k tomuto účelu zvláště navržené primery Tu1sekvF a Tu2sekvR (Gryndler et al., 2011).

Při detekci lanýže letního za použití specifických primerů (Tu1sekvF a Tu2sekvR) pro tento druh jsem pouze v jednom případě zaznamenal jeho výskyt. Jde o vzorek č. 86 odebraný v roce 2013 (obr. 14).

Pro ověření, zda byl skutečně vzorek č. 86 (označený 86 (13)) pozitivní pro druh *Tuber aestivum*, byl v roce 2014 proveden opakovaný odběr vzorku ektomykorhiz z lokality č. 86, který byl označen jako vzorek č. 86 (14) (obr. 15). Po porovnání sekvencí vzorků č. 86 (13) a 86 (14) pomocí genetické databáze GenBank, byly nalezeny shody s publikovanými sekvencemi patřící druhu *Tuber aestivum*. U vzorku 86 (13) šlo o 100% shodu a u vzorku 86 (14) šlo o 99% shodu (viz tabulka 6).

Dva nezávisle odebrané vzorky z lokality č. 86 byly analyzovány proto, že analýza probíhala na pracovišti, které se systematicky zabývá studiem lanýže letního a nebylo proto možno zcela vyloučit možnost kontaminace PCR DNA lanýže letního přítomné v laboratoři. Opakované vyšetření vzorků z této lokality však potvrdilo, že ke kontaminaci nedošlo, a že DNA náležející lanýži letnímu je na lokalitě skutečně přítomna.

Protože podobnost sekvencí s nejpodobnějším druhem, je u některých vzorků poměrně nízká (93%, 94%, 95%, 96%, 97% a 98%) a ve dvou případech se jednalo o tzv. „uncultured fungus“ neboli neidentifikovaný druh (Genbank), mohlo by se zde jednat o dosud nepopsané druhy rodu *Tuber*.

Po vyhodnocení všech výsledků mé práce se zdá, že druhem lanýžů převládajícím v zájmovém území je *Tuber borchii*. Je to způsobené zřejmě jeho schopností úspěšně soutěžit s ostatními ektomykorhizními houbami, jak bylo zmíněno v práci Zambonelliové et al. (2000), a také díky tomu, že toleruje mírně kyselé půdy (Mello et al., 2006).

V případě lanýže letního (*Tuber aestivum*), kterého se mi podařilo detekovat pouze na jedné lokalitě, jsem došel k závěru, že nejenže není převládajícím druhem lanýžů v zájmovém území, ale je zde i vzácný.

Tento závěr však může být zkreslen tím, že se mi nepodařilo odebrat dostatečné množství vzorků půdy s vyšším pH, přičemž pH je důležitým faktorem ovlivňujícím výskyt lanýže letního, jak jsem se mohl přesvědčit v pracích od Gažo et al. (2005), Mello et al. (2006), Pruett et al. (2008) a García-Montero et al. (2009).

Domnívám se, že příčinou by mohla být acidifikace vrchních vrstev půd na sledovaném území. pH odebrané vrchní vrstvy půdy proto nemuselo odpovídat pH uvedenému na mapě půdního pH podle katastrálních území. Je možné, že půdy mnou zvolených lokalit mají extrémní vlastnosti, a proto nejsou zemědělsky využívány. Z tohoto důvodu nemusí jejich vlastnosti být reprezentativní pro půdy daného území. Domnívám se však, že lepší odběrová místa není kvůli charakteru terénu možné zvolit. Alkalické půdy severních Čech jsou bohaté minerálními živinami a jsou proto již zemědělsky využity (Kuncová, 1999). Zemědělské využití zároveň vylučuje výskyt hostitelských dřevin, což diskvalifikuje lanýže jako složku mikrobiálního společenstva zemědělských půd.

V kapitole (2.3.8) jsem se snažil postihnout faktory prostředí, které by mohly být důležité nebo určující pro výskyt lanýžů. Po vyhodnocení dat získaných díky mnohorozměrné analýze jsem dospěl k závěru, že v zájmovém území se mnou zachycené druhy lanýžů vyskytují více v místech, kde je hostitelskou rostlinou převážně habr, lípa a líska. V případě *T. borchii* díky negativní korelaci s hostitelskými rostlinami se zdá, že nepreferuje určitý druh hostitelské rostliny (obr. 18).

Co se týče faktorů, které byly naměřeny v laboratoři (Ca, pH, vodivost a trofický potenciál), tak zřejmě nemají zásadní vliv na výskyt identifikovaných lanýžů, protože ve většině případů šlo o negativní korelaci s těmito faktory (obr. 19).

Dalším faktorem, který jsem vzal v potaz, byla nadmořská výška. Kromě *T. foetidum*, který měl malou tendenci se vyskytovat ve vyšších nadmořských výškách, žádný z ostatních lanýžů nevykazoval pozitivní korelaci s tímto faktorem (obr. 20).

Posledním faktorem byl vztah podrostu v okolí hostitelských rostlin s detekovanými druhy lanýžů. Díky obrázku č. 21 jsem dospěl k závěru, že houby měly slabou vazbu na podrost. Pozitivní korelaci s *Hepatica nobilis* jsem zaznamenal u *T. borchii*, *T. foetidum* pozitivně koreloval s *Galium odoratum* a *Impatiens parviflora*.

Působení všech faktorů zmíněných výše se však projevovalo velmi slabě, vysvětlily pouze malou část variability a nelze konstatovat, že by některý z nich byl určující pro výskyt či absenci druhu ve vzorku. Po osobní komunikaci se svým školitelem Milanem Gryndlerem se domnívám, že nejdůležitějším faktorem je asi voda, přičemž zájmové území spadá do klimatických regionů T1 a T2 (teply suchý a teplý mírně suchý). Nedostatek vody může být proto důvodem, který omezuje výskyt *Tuber aestivum*. Tato hypotéza však nemohla být ověřena, protože jsem nemohl umístit na každou lokalitu



(celkem na 190 lokalit) datalogger, který by zaznamenával po delší dobu údaje týkající se právě vody.

V kapitole (2.3.9) jsem se snažil vyhovět dalšímu z cílů své práce, tedy zda se lanýže vyskytují v půdách svahů. Z obrázku č. 22 můžeme vidět, že se lanýže na studovaném území svahům nevyhýbají, a že je zde jejich výskyt dokonce častější než na lokalitách mimo svah. Důvod proč tomu tak je, mi není zřejmý. Toto zjištění je velmi důležité, protože ukazuje možnost využití svahů k případnému pěstování lanýžů, pokud toto pěstování umožní legislativa. Tato možnost vychází z předpokladu, že ekologické nároky (tolerance k prostředí svahů) jsou podobné u lanýže letního a ostatních zde hodnocených druhů lanýžů. Tento předpoklad je pravděpodobně oprávněný, protože i na Slovensku byly zaznamenány výskyty lanýže letního v půdách svahů (J. Gažo a M. Miko, Polnohospodárska Univerzita Nitra, Slovensko, osobní sdělení).

V práci nejsou vypsány místopisné koordináty (tj. GPS souřadnice), které jsem zaznamenal na každé lokalitě. Důvodem, proč jsem tato data nezveřejnil, je to, že ČR začíná být cílem nájezdů ilegálních sběračů lanýžů, kteří svými nezákonnými aktivitami lokality poškozují a publikace přesných poloh nalezišť lanýžů by mohla situaci dále zhoršit. Data byla získána s finanční podporou grantu GAČR P504/10/0382 v MBÚ AVČR Praha a jsou k dispozici pouze orgánům státní správy.

## ZÁVĚR

Zdá se, že by na studovaném území bylo možné lanýže pěstovat, ale bylo by to velmi náročné. Jde o poměrně složitý proces, který vyžaduje velkou technologickou kázeň a trpělivost, protože první sklizeň je možné očekávat nejdříve za 8 až 10 let. Pěstování lanýžů (zejména lanýže letního *Tuber aestivum*) by se však mohlo stát vítaným způsobem využití jinak hospodářsky nevyužitelných půd (svahoviny).

V české kuchyni není lanýž používán, není to tradiční česká surovina. Proto, aby se mohl rozšířit, musí být provedena osvěta, jak s touto surovinou nakládat, protože mnoho lidí nemá představu, co to vlastně lanýž je. Na větší rozšíření v české gastronomii má vliv i jeho cena, protože v současné době je to pokrm pro labužníky.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ana Villares., Ana García-Lafuente., Eva Guliamón., Álvaro Ramos (2012): Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. truffles. – Journal of Food Composition and Analysis YJFCA-2182; No. of Pages 6.

Berthaud G., Raymond M., Berthomieu A., Callot G. et Fernandez D. (1998): Trifling variation in truffles. – Nature 394: 734.

Bertini L., Amicucci A., Agostini D., Polidori E., Potenza L., Guidi C., Stocchi V. (1999): A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in *Tuber* species. FEMS Microbiology Letters 173: 239–245.

Bratek Z., Bagi I., Paradi I. et Viktor J. (2001): Differentiation among truffle species based on habitat preferences. – In: Savignac J. C. (ed.), Actes du Vème Congrès International Science et Culture de la Truffe et des autres Champignons Hypogées Comestibles, 4–6 mars 1999, p. 193–195, Aix-en-Provence.

Ceruti A., Fontana A. et Nosenzo C. (2003): The specie europea del genere *Tuber*. Una revisione storica. – 467 p. Torino.

Culleré L., Ferreira V., Chevret B., Venturini ME, Sánchez-Gimeno AC, Blanco D. (2010): Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry. Food Chem. 122: 300–306.

García-Montero L. G., Quintana A., Valverde-Asenjo I., Díaz P. (2009): Calcareous amendments in truffle culture: a soil nutrition hypothesis. Soil Biol Biochem 41: 1227–1232.

Gardes M. et Bruns TD. (1993): ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. Mol Ecol 2: 113–118.

Gažo J. et Miko M. (2005): Genofond hluzovky letnej (*Tuber aestivum* Vitt.) na Slovensku [Gene fund of the summer truffle (*Tuber aestivum* Vitt.) in Slovakia]. – Genofond (Piešťany) 9: 18–19.

Gažo J., Miko M. et Chevalier G. (2005): Prve poznatky z inventarizačného výskumu hospodarsky významných druhov hluzoviek (*Tuber*) v pohorí Tribeč [First results of inventory research on economically important species of truffles (*Tuber*) in the Tribeč mountains]. – Acta Fytotechnica and Zootechnica 3, Slovaca Universitas Agriculturae Nitrae, p. 66–71, Nitra.

Glass NL et Donaldson GC (1995): Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microb.* 61: 1323–1330.

Gryndler M., Baláž M., Hršelová H., Jansa J., Vosátka M. (2004): Mykorhizní symbióza – o soužití hub s kořeny rostlin. – 399 p., Academia, Praha. ISBN 80–200–1240–0.

Gryndler M., Hršelová H., Soukupová L., Streiblová E., Valda S., Borovička J., Gryndlerová H., Gažo J., Miko M. (2011): Detection of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) in ectomycorrhizae and in soil using specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 318: 84–91.

Gryndler M., Soukupová L., Hršelová H., Gryndlerová H., Borovička J., Streiblová E., Jansa J. (2013): A quest for indigenous truffle helper prokaryotes. *Environ Microbiol Rep* 5: 346–352.

Hilszczańska D., Sierota Z. et Palenzona M. (2008): New *Tuber* species found in Poland. – *Mycorrhiza* 18: 223–226.

Holec J. et Beran M. (2006): Červený seznam hub (makromycetů) České republiky. – *Příroda* 24: 1–282.

Holec J., Bielich A., Beran M. (2012): Přehled hub střední Evropy, Academia Praha, 624 pp., ISBN 978–80–200–2077–2.

Houda J. (1994): Zpráva o pěstování a nálezech lanýžů v okrajové oblasti Džbánu. – *Mykol. Sborn.* 71: 91–93.

Iotti M., Amicucci A., Stocchi V., Zambonelli A. (2002): Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytol* 155: 499–505.

Iotti M., Amicucci A., Bonito G., Bonuso E., Stocchi V. et Zambonelli A. (2007): Selection of a set of specific primers for the identification of *Tuber rufum*: a truffle species with high genetic variability. *FEMS Microbiol Lett* 277: 223–231.

Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. – Praha: Karolinum, 2005. 606 s. 1. vydání. ISBN 80–246–1036–1.

Kotlaba F. (1992): Houby poprvé u nás chráněny zákonem. – *Mykol. Listy* no. 48: 24–26.

Kotlaba F. (1994): Rukopis Červené knihy – nižší rostliny. – *Mykol. Listy* no. 51: 18–24.

Kotlaba F. et al. (1995): Červená kniha ohrožených a vzácných druhů rostlin a živočichů SR a ČR. Sinice a riasy. Huby. Lišajníky. Machorasty. 4. díl – 220 p., Příroda, Bratislava. ISBN 80–07–00735–0.

Kuncová J. (1999): Chráněná území ČR. Ústecko – Praha, AOPK ČR a SF ŽP.

Martin K. J. et Rygiewicz P. T. (2005): Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology 5: 28.

Mello A., Cantisani A., Vizzini A., Bonfante P. (2002): Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. Environ. Microbiol. 4(10): 584–594.

Mello A., Murat C., Bonfante P. (2006): Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. FEMS Microbiology Letters 260: 1–8.

Montecchi A. et Sarasini M. (2000): Funghi ipogei d'Europa. – 714 p. Trento, Italy.

Neuhäuslová Z., Moravec J. (1997): Mapa potenciální přirozené vegetace České republiky. – Kartografie Praha.

Nováková K. (2013): Studium výskytu lanýže letního (*Tuber aestivum* Vitt.) ve vybraných oblastech jižní Moravy (bakalářská práce). – Ústí nad Labem. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně. Přírodovědecká fakulta, 2013. 50 s.

Pal-Fam F. (2001): Macrofungi inside the city of Budapest. – In: Salaš P. (ed.), Proceedings of the 9th International Conference on Horticulture, September 3–6 2001, Lednice, Vol. 3, p. 553–557, Czech Republic.

Paolocci F., Rubini A., Riccioni C., Topini F., Arcioni S. (2004): *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? FEMS Microbiol Lett 235: 109–115.

Pomarico M., Figliuolo G., Rana G.L. (2007): *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution areas. Biodivers Conserv. 16: 3447–3461.

Pruett G. E., Bruhn J. N., Mihail J. D. (2008): Temporal dynamics of ectomycorrhizal community composition on root systems of oak seedlings infected with Burgundy truffle. Mycological Research 112: 1344–1354.

Pruett G. E., Bruhn J. N., Mihail J. D. (2009): Greenhouse production of Burgundy truffle mycorrhizae on oak roots. New Forests 37: 43–52.

RiOUSset L., RiOUSset G., Chevalier G., Bardet M. C. (2001): Truffes d'Europe et de Chine. – 181 p., INRA, Paris. ISBN: 2–7380–0932–8.

- Rivera C. S., Blanco D., Marco P., Oria R., Venturini M. E. (2011): Effects of electron-beam irradiation on the shelf life, microbial populations and sensory characteristics of summer truffles (*Tuber aestivum*) packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology* 28: 141–148.
- Skála E. (2001): Lanýže (*Tuber*) rostou i na Teplicku [Truffles (*Tuber*) growing in Teplice region as well]. – *Mykol. Listy* 77: 5–9.
- Smith S. E., Read D. J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd edn. Academic Press. ISBN 978-0-12-370526-6.
- Splivallo R., Valdez N., Kirchhoff N., Ona MC., Schmidt J-P., Feussner I., Karlovsky P. (2012): Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytol.* 194(3): 823–835.
- Streiblová E., Gryndlerová H., Valda S. a Gryndler M. (2010): *Tuber aestivum* – opomíjená podzemní houba České republiky. Shrnující údaje. – *Czech Mycol.* 61(2): 163–173.
- Streiblová E., Gryndlerová H., Gryndler M. (2012): Lanýže: mykologické téma v evropském kontextu. – *Mykol. Listy* no. 120: 15–24.
- Tang Y., Li H, Tang Y. (2012): Comparison of sterol composition between *Tuber* fermentation mycelia and natural fruiting bodies. *Food Chem.* 132(3): 1207–1213.
- Valda S. (2009): Monitoring *Tuber aestivum* Vittad. Na území České republiky. – Závěrečná zpráva o chráněné krajině v oblasti Kokořínsko, Mělník.
- Valda S. (2009): Příspěvek k poznání našich podzemních hub – 1. část: Ascomycota. – *Mykol. Listy* no. 108: 1–13.
- Wang YJ, Tan ZM, Murat C., Jeandroz S, Le Tacon F (2007): Molecular taxonomy of Chinese truffles belonging to the *Tuber rufum* and *Tuber puberulum* groups. *Fung. Divers.* 24: 301–328.
- Weden C., Chevalier G., Danell E. (2004): *Tuber aestivum* (syn. *T. uncinatum*) biotopes and their history on Gotland, Sweden. – *Mycological Research* 108: 304–310.
- Zambonelli A., Iotti M., Rossi I. et Hall I. (2000): Interaction between *Tuber borchii* and other ectomycorrhizal fungi in a field plantation. *Mycol Res* 104: 698–702.
- Zampieri E., Mello A., Bonfante P. et Murat C. (2009): PCR primers specific for the genus *Tuber* reveal the presence of several truffle species in a truffle-ground. *FEMS Microbiol. Lett.* 297: 67–72.

## **ELEKTRONICKÉ ZDROJE**

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

<http://www.asturnatura.com/fotografia/setas-hongos/tuber-rufum-forma-rufum-pico-fr-1/4288.html>

<http://www.actaplantarum.org/floraitaliae/viewtopic.php?t=46282>

<http://www.trufamania.com/Tuber%20borchii%20English.htm>

<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id59709/>

## PŘÍLOHY



Příloha 1. Míchačka typu „Vortex“.



Příloha 2. Spektrofotometr „Nanodrop“ (Thermo Scientific).



Příloha 3. Příklad zvaný „Termocykler“ pro průběh PCR.



Příloha 4. Kultura zelené řasy *Chlorella kessleri* (kmen Larg/-1).