

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Markéta Charvátová

Změny struktury a funkce společenstva hub v půdním prostředí po ukončení toku asimilátů u smrku ztepilého (*Picea abies*)

Change of structure and function of a fungal communities in the soil environment after the end of the flow assimilates with Norway spruce (*Picea abies*)

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Petr Baldrian Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze dne

.....

Markéta Charvátová

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Baldrianovi, Ph.D., za cenné rady a trpělivost při vedení této diplomové práce. Velké poděkování patří také všem kolegům z Laboratoře environmentální mikrobiologie za cenné rady a ochotu kdykoliv pomoci. Ráda bych poděkovala i své rodině a příteli za všeobecnou podporu.

Tato práce byla financována grantem Grantové agentury České republiky č. 13-06763S.

Abstrakt

V průběhu dekompozice rostlinné biomasy dochází ke změně složení společenstva hub, které mají zásadní význam v rozkladu organické hmoty na základě produkce svých extracelulárních enzymů. V důsledku značné heterogenity půdního prostředí je zastoupení hub a aktivita jejich enzymů různá a specifická pro jeho jednotlivé komponenty.

Práce byla zaměřena na význam hub asociovaných s kořeny smrku ztepilého (*Picea abies*). Pro experiment byl vybrán lesní porost s převahou smrku ve Školním lesním podniku Křtiny na Moravě. Cílem bylo porovnat složení společenstva hub v kořenech, rhizosféře a půdě a popsat jeho postupný vývoj po ukončení toku asimilátů v důsledku vykácení porostu. Dalším úkolem bylo kultivovat, popsat a charakterizovat společenstvo hub rozkládající kořeny po 5 a 9 měsících. Identifikace izolátů proběhla na základě izolace houbové DNA a následné sekvenace. Na základě detekce enzymatické aktivity byly stanoveny degradační schopnosti izolátů pro lignocelulózový komplex rostlinné biomasy. Složení společenstva hub bylo popsáno pomocí sekvenace environmentální DNA na platformě Illumina. Před ukončením toku asimilátů, u živých stromů, patřilo zástupcům ektomykorhizních (ECM) hub 60 % sekvencí. První rok po ukončení toku asimilátů byl pozorován nárůst saprotrofů, zástupců především z pododdělení Mortierellomycotina (z 5 % na 10 %) a Mucoromycotina (z 2 % na 8 %). Někteří saprotrofní zástupci vykazovali preferenci pro některý z kompartmentů. Saprotrofní zástupci *Mycena*, *Phylocephala* vykazovali preferenci pro kořeny. V půdním prostředí (rhizosféra a okolní půda „bulk soil“) naopak vzrostla abundance zástupců *Mortierella* a *Umbelopsis*, jejichž zastoupení v kořeni bylo minimální.

Zástupce *Hypocrea atroviridis*, který je pro půdní prostředí typický, spadl mezi kultivovatelné a dominantně zastoupené saprotrofy na kořenech *Picea abies*. U většiny izolovaných zástupců byla detekována nejvyšší aktivita β -glukosidázy, chitinázy a fosfatázy. Dekompozice kořenů byla zaznamenána již jeden měsíc po pokácení stromů a během jednoho roku byly kořeny rozloženy až z 61 %. V počáteční fázi dekompozice se pravděpodobně na tomto rozkladu mohou podílet jak saprotrofní, tak i ECM zástupci.

Klíčová slova: houby, mykorhiza, půda, endofyt, rhizosféra, ekologie

Abstract

The decomposition of plant biomass is associated with changes of the associated fungal community which is crucial in the process of degradation due to their production of extracellular enzymes. Moreover, fungal communities as well as enzymatic activity are specific for soil microhabitats.

This thesis focused on the importance of fungi associated with the roots of Norway spruce (*Picea abies*) trees. Forest with dominating Norway spruce, located in the School Forest Enterprise Křtiny area in Moravia, was selected for the experiment. The aim of this thesis was to compare the community composition of fungi in the roots, rhizosphere and bulk soil and to describe the gradual development of this community after the death of the roots. The next aim was to isolate, describe and characterize those fungi that decomposed roots 5 and 9 months after tree harvest. Identification of fungal isolates was based on DNA sequencing. Degradation capabilities were determined as the activity of enzymes involved in the degradation of lignocellulose. Composition of fungal communities was described by sequencing of environmental DNA on the Illumina platform. Before the flow of assimilates from the live trees stopped, communities of ectomycorrhizal fungi dominated with 60 % of all sequences. Increased abundance of saprotrophic fungi was observed during the first year without the flow of assimilates. The saprotrophs were especially from subdivision Mortierellomycotina (from 5 % to 10 %) and Mucoromycotina (from 2 % to 8 %). Some saprotrophs showed preference for specific compartments of soil. The genera *Mycena* and *Phialocephala* preferred roots. *Mortierella* and *Umbelopsis* preferred rhizosphere and bulk soil and showed only a minimal presence in the roots. *Hypocrea atroviridis* was typical for the soil environment. I have cultivated it from *Picea abies* roots. These abundant fungi exhibited high activity of enzymes. Highest activity was observed for the enzymes β -glucosidase, chitinase and phosphatase.

Decomposition of roots took place as early as one month after tree removal and after a year as much as 32 % of the root mass was decomposed. At the early stage of decomposition both saprotrophic and ectomycorrhizal fungi may contribute to root decomposition.

Key words: fungi, mycorrhiza, soil, endophyte, rhizosphere, ecology

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah	6
Seznam zkratek.....	9
1 Úvod.....	10
2 Literární přehled	11
2.1 Jehličnatý les a smrk ztepilý (<i>Picea abies</i>)	11
2.2 Půda a kořen.....	11
2.2.1 Kořenové exsudáty	13
2.2.2 Rhizosféra a okolní půda („bulk soil“).....	13
2.3 Houby v lesní půdě a jejich životní strategie	14
2.3.1 Mykorhizní symbióza	15
2.3.2 Ektomykorhizní houby	16
2.3.3 Složení společenstva hub v lesní půdě	17
2.4 Houby asociované s kořeny smrku	18
2.4.1 Ektomykorhizní houby	19
2.4.2 Saprotrofní houby	20
2.4.3 Druhy parazitické a patogenní	20
2.5 Dekompozice rostlinné biomasy	21
2.5.1 Houby a bakterie v půdním prostředí	21
2.5.2 Enzymy hub podílející se na degradaci rostlinné biomasy.....	22
2.5.3 Dekompoziční schopnosti saprotrofních hub	27
2.5.4 Dekompoziční schopnost ektomykorhizních hub.....	29
2.6 Půda a kořen po ukončení toku asimilátů	31
3 Cíle práce.....	33

4	Materiál a metodika.....	34
4.1	Studovaná lokalita.....	34
4.2	Představení experimentu.....	35
4.3	Odběr vzorků	35
4.4	První experiment: Izolace celkové DNA z kořenů, rhizosféry a okolní půdy	37
4.4.1	Izolace DNA z kořenů	37
4.4.2	Izolace houbové DNA z rhizosféry a okolní půdy	38
4.4.3	Přečistění izolované DNA z kořenů, rhizosféry a okolní půdy	38
4.5	První experiment: Identifikace hub pomocí PCR a NGS sekvenování	39
4.5.1	PCR amplifikace oblasti ITS2	39
4.5.2	Příprava DNA knihovny a sekvenace.....	40
4.5.3	Bioinformatické zpracování sekvencí – sekvenace MiSeq	41
4.6	První experiment: Stanovení enzymatické aktivity	43
4.7	První experiment: Stanovení houbové biomasy.....	44
4.8	První experiment: Stanovení rychlosti dekompozice kořenů, elementární analýza a stanovení pH	45
4.9	Druhý experiment: Izolace a charakterizace hub z kořenů smrku.....	45
4.9.1	Kultivace a izolace hub.....	45
4.9.2	Izolace DNA z izolátů	45
4.9.3	PCR amplifikace oblasti ITS1F.....	46
4.9.4	Stanovení enzymatické aktivity u vybraných extracelulárních degradačních enzymů.....	47
4.10	Statistické metody	49
4.11	Složení roztoků a médií pro izolaci hub.....	49
5	Výsledky.....	50
5.1	Charakteristika společenstva hub za přísunu asimilátů a po ukončení toku asimilátů z kořenů do půdního prostředí <i>Picea abies</i> a postupný vývoj mikrobiálního složení hub v kořenech, rhizosféře a půdě v čase a prostoru	50

5.1.1	Obsah biomasy hub	50
5.1.2	Složení společenstva hub za přísunu asimilátů a po ukončení toku asimilátů z kořenů do půdního prostředí <i>Picea abies</i> - v kořenech, rhizosféře a půdě..	51
5.1.3	Aktivita extracelulárních enzymů přítomných v kořeni, rhizosféře a okolní půdě účastnících se dekompozice látek v nich obsažených	57
5.1.4	Stanovení rychlosti dekompozice kořenů, elementární analýza a stanovení pH dekompozice kořenů.....	60
5.1.5	Stanovení pH a elementární analýza	60
5.2	Porovnání složení společenstva hub z kořenů 5 a 9 měsíců po ukončení toku asimilátů.....	62
	Diskuze	67
	Souhrn	72
	Seznam literatury	74
	Příloha.....	84

Seznam zkratek

ABTS	Azinobisetylbenzothiazolinsulfonová kyselina
ANOVA	Analysis of variance, analýza rozptylu
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovinní sérový albumin
CTAB	Cetrimoniumbromid
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotid
ECM	Ektomykorhizní
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonová kyselina
ITS	Internal transcribed spacer; vnitřní přepisový mezerník
kkH ₂ O	Kohoutková klávaná voda
LiP	Lignin peroxidáza
MBTH	Methylbenzothiazolinon hydrazon
ME	Malt Extract; sladinový extrakt
MERBS	Malt Extract-Rose Bengal
MnP	Manganová peroxidáza
MUF	Methylumbellyferol
NAG	N-acetylglukosamin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OTUs	Operační taxonomické jednotky
PCR	Polymerázová řetězová reakce
SDS	Dodecylsírán sodný
ssDNA	single strand DNA; jednořetězcové vlákno DNA
TAE	Tris-acetát-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VP	Versatilní peroxidáza

1 Úvod

Kořeny představují specifickou niku a oproti okolní půdě se jedná o prostředí s podstatně vyšší dostupností živin, zejména díky přísunu asimilátů vznikajících v procesu fotosyntézy. V blízkosti kořene jsou tyto látky produkovány ve formě kořenových exsudátů a využívány řadou půdních mikroorganismů. Jedná se především o vláknité houby a bakterie. Tyto mikroorganismy mohou naopak čelit i nedostatku některých živin - limitujících prvků jako je N a P, které jim obvykle rostliny neposkytují. Na rozdíl od bakterií jsou vláknité houby schopné tyto látky transportovat z okolní půdy. Typickým příkladem jsou ECM (ektomykorhizní) houby asociované s kořeny dřevin.

Saprotrofní zástupci, stejně jako ECM zástupci hub jsou schopní produkovat širokou škálu enzymů, kterými přispívají ke koloběhu látek v ekosystému. Jedná se o extracelulární nebo na buněčné stěny vázané degradační enzymy hydrolytického a oxidačního charakteru, které jsou nezbytné v procesu rozkladu lignocelulózového komplexu biomasy rostlin. K tomu dochází po ukončení toku asimilátů. Tímto je zajištěn tok látek v ekosystému (Courty *et al.*, 2010a). Zástupci ECM hub mohou představovat až 1/3 z celkové mikrobiální biomasy lesních půd (Högberg a Högberg, 2002), a proto význam ECM hub se zdá být v procesech cyklu uhlíku zásadní (Courty *et al.*, 2010a).

Práce se zabývá popisem společenstva hub v kořenech, rhizosféře a okolní půdě („bulk soil“) u smrku ztepilého (*Picea abies*) na úrovni DNA. Pomocí sekvenační techniky nové generace bylo popsáno celkové spektrum hub ve smrkovém porostu a následná změna po jeho vykácení, které mělo za následek ukončení přísunu asimilátů. Degradační schopnosti hub byly stanoveny na základě produkce extracelulárních enzymů. Houby asociované s kořeny smrku po ukončení toku asimilátu byly dále kultivovány a izolovány v čistých kulturách, u kterých byla také stanovena aktivita extracelulárních enzymů, účastnících se degradace lignocelulózového komplexu.

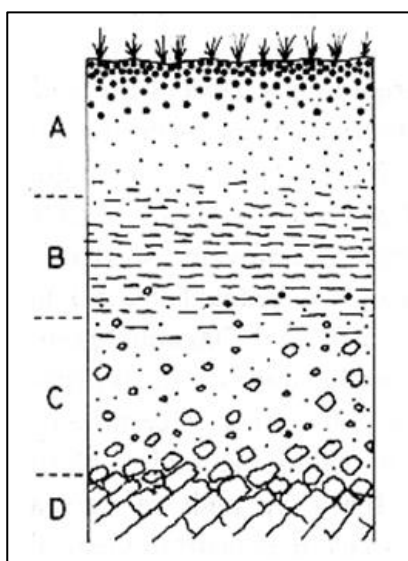
2 Literární přehled

2.1 Jehličnatý les a smrk ztepilý (*Picea abies*)

V terestrickém ekosystému severní polokoule Země představují jehličnaté lesy významnou dominantu. Jedná se o pásmo subpolární, mírné a z části i subtropické (Lindahl *et al.*, 2002). Jako součást boreálních lesů, které pokrývají cca 11 % zemského povrchu, tak mohou konkurovat s tropickými deštnými pralesy (Persson, 1980). V jehličnatých lesích na území České republiky je hlavní dominantou stálezelený smrk ztepilý (*Picea abies*) z čeledi borovicovité (*Pinaceae*). Jeho kořenová soustava je mělká a bez hlavního kořene (Kremer, 1995).

2.2 Půda a kořen

Pro půdu je charakteristická její prostorová heterogenita. Je složena z částic s různými vlastnostmi a sled na sobě ležících vzájemně odlišných půdních vrstev vytváří tzv. půdní profil (Obr. 1). K heterogenitě půdy přispívají i faktory, jako nerovnoměrné rozmístění kořenů rostlin a půdních mikroorganismů, které do jisté míry tento půdní profil kopírují (Dickie *et al.*, 2002; Rosling *et al.*, 2003).

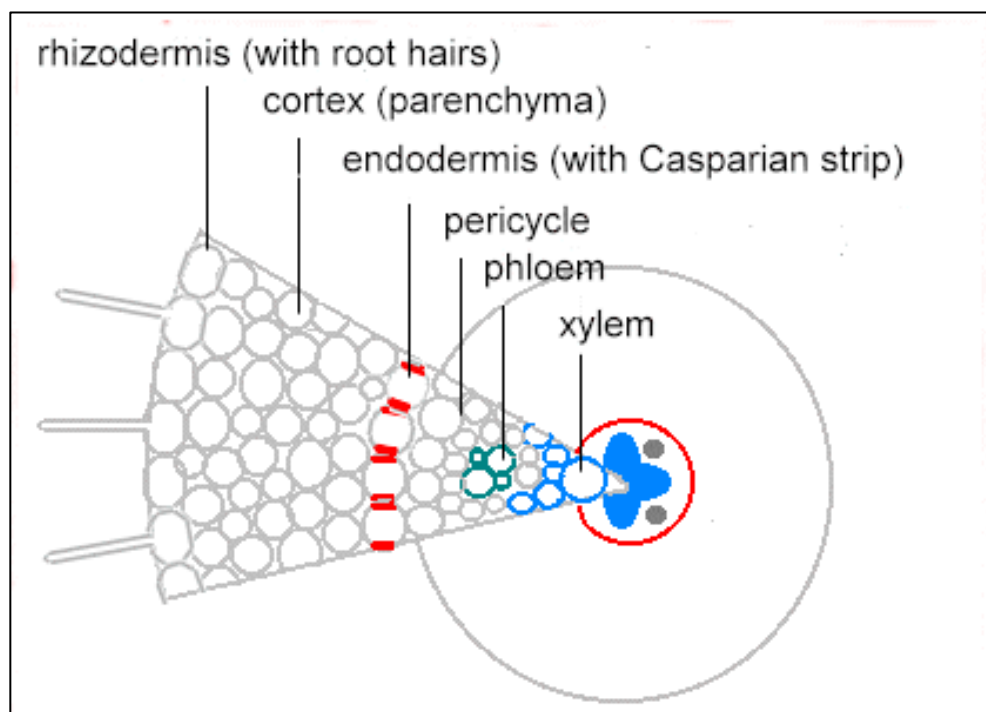


Obrázek 1: Půdní profil (schéma). Vertikální řez půdou: **A** - Organický svrchní horizont, **B** - Minerální horizont, **C** - Horizont převážně jílovitý, obohacený o minerální látky, **D** - Podpovrchový horizont a mateční hornina (převzato z: <http://geology.cz>).

Nejsvrchnější vrstvou půdního profilu je organický svrchní horizont – svrchní humus s vysokým obsahem organických látek z odumřelých částí rostlin. Níže se nacházejí minerální horizonty. Ty obsahují minerální sorpční komplex, který vzniká mísením minerálních látek s humifikovanou hmotou. Následují podpovrchové horizonty, které mají významnou roli pro vodní režim půdy. V případě zhoršené propustnosti těchto horizontů dochází k zamokření půdy a zvyšování koncentrace CO₂. Hluběji jsou substrátové horizonty a mateční hornina.

Heterogenní a proměnlivé vlastnosti půdy mají vliv i na rozložení kořenového systému rostlin (Gryndler *et al.*, 2004), který slouží k upevnění rostliny v půdě, k příjmu vody a látek v ní rozpuštěných. Slouží také jako zásobní orgán, kde jsou ukládány asimiláty vzniklé v procesu fotosyntézy (Votrubová, 2001).

S půdním prostředím je kořen propojen přes vlákna mykorhizních hub (popsáno v kapitole 2.3.1. Mykorhizní symbióza), které kolonizují vnější vrstvy buněk kořene - kořenovou pokožku (rhizodermis) a primární kůru kořene (cortex). Dále do středu kořene mykorhizní houby obvykle nepronikají. Střed kořene je vyplněn vodivými pletivy (floem, xylen), které je ohraničeno pericyklem (Obr. 2; Gryndler *et al.*, 2004).



Obrázek 2: Kořen (schéma). Výseč příčného řezu kořenem: **rhizodermis** - pokožka, **cortex** – kůra, **endodermis** - nevnitřnější vrstva kořenové kůry, **pericycle** - vrstva parenchymatického pletiva, **phloem** a **xylem** - vodivá pletiva (převzato z: https://s10.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/e05/05b.htm).

2.2.1 Kořenové exsudáty

Do půdního prostředí produkují kořeny rostlin chemické látky, které jsou obecně označovány jako kořenové exsudáty. V bezprostřední blízkosti kořene je v důsledku přítomnosti exsudátů regulováno mikrobiální společenstvo, podporován vznik výhodných symbiotických vztahů a případně dochází k inhibici růstu konkurenčních rostlinných druhů (Nardi *et al.*, 2000). Tyto látky tedy slouží také jako významné chemické atraktanty v rhizosféře - v půdě, která je v bezprostředním kontaktu s kořeny rostlin (Estabrook a Yoder, 1998). Produkci kořenových exsudátů je uvolňován asimilovaný uhlík, vzniklý v procesu fotosyntézy. Jedná se o pozoruhodný proces, kdy rostlina uvolňuje 5 až 21 % pevného uhlíku (Marschner, 1995), což představuje značné náklady pro hostitelskou rostlinu. Tyto látky nízkomolekulární (aminokyseliny, organické kyseliny, cukry, fenoly a sekundární metabolity) a vysokomolekulární povahy (polysacharidy, bílkoviny; Ryan a Delhaize, 2001) jsou pravděpodobně syntetizovány na povrchu endoplasmatického retikula (Winkel-Shirley, 2001).

Rostlina produkcí specifických exsudátů může podporovat růst a aktivitu mikroorganismů, které budou potlačovat působení případných patogenů v blízkosti kořene (Berendsen *et al.*, 2012). Dále mohou být produkovány jiné specifické exsudáty, např. fytoalexiny či proteiny, které zajišťují přímou ochranu před útokem patogenů, jejichž výskyt v půdním prostředí je více než častý (Flores *et al.*, 1999).

Kořenové exsudáty hrají také důležitou roli v pozemních interakcích rostlinných společenstev. Mezi kořeny rostlin, které jsou v přirozených podmínkách v neustálém kontaktu, dochází k alelopatickým interakcím právě vlivem těchto sekundárních metabolitů (Callaway a Aschehoug, 2000)

2.2.2 Rhizosféra a okolní půda („bulk soil“)

Kořeny rostlin do svého okolí uvolňují v podobě exsudátů velké množství energeticky bohatých látek a tím dochází ke změnám ve fyzikálně-chemických vlastnostech půdy v blízkosti kořene podporující výskyt půdních mikroorganismů. Tento fenomén byl označen jako rhizosférický efekt. Samotný výraz rhizosféra poprvé použil prof. L. Hiltner (1904). K dalším faktorům, které mají vliv na charakter rhizosféry patří typ půdy, půdní vlhkost, pH, teplota a stáří rostlin (Katznelson, 1946; Timonin, 1966).

Jedním ze základních rozdílů mezi rhizosférou a okolní půdou je četnost mikroorganismů. Vyšší mikrobiální aktivita je obecně přiřazována rhizosféře, která úzce přiléhá ke kořenům rostlin a je v důsledku produkce kořenových exsudátů kolonizována bakteriemi, houbami a dalšími mikroorganismy (Mukerji *et al.*, 2006). Rozdíl lze vyjádřit jako poměr R/B, který je dán počtem mikroorganismů v rhizosféře (R) k počtu mikroorganismů v okolní půdě (B; Katznelson, 1946; Timonin, 1966).

2.3 Houby v lesní půdě a jejich životní strategie

Houby jsou eukaryotní organismy s heterotrofním způsobem života. Mohou se vyskytovat ve formě kulovité (kvasinky) nebo vláknité (hyfy). Vláknitá forma je v terestrickém prostředí v mnoha ohledech výhodnější – umožňuje pronikání pevným materiálem i růst v nehostinném půdním prostředí (Hoffland *et al.*, 2004; Klein a Paschke 2004). K další významné vlastnosti hyf patří také schopnost translokace živin, tedy transport látek do míst s nízkým obsahem živin a prvků, které jsou nezbytné pro metabolickou aktivitu mycelia (Frey *et al.*, 2000). Často se jedná o rychle rostoucí druhy (oportunisté) produkující velké množství spor nebo melanizované klidové struktury, schopné přežít v nehostinných podmínkách (van der Wal *et al.*, 2009). Na základě této jejich úspěšné strategie růstu a úspěšné formě růstu jsou houby významnou součástí půdního ekosystému (de Boer *et al.*, 2005), kde mohou vykazovat různé životní strategie.

V případě dekompozice odumřelé organické hmoty se jedná o tzv. saprotrofii (James *et al.*, 2006). U tohoto způsobu života je schopnost rozkladu podpořena nejen morfologií, ale také fyzikálními vlastnostmi - produkcí extracelulárních enzymů, účastnících se degradace lignocelulózového komplexu (Baldrian a Valášková, 2008). Vzhledem ke každoročnímu přírůstku rostlinné biomasy, nadzemního a podzemního opadu a odumřelé živočišné hmoty je význam saprotrofních hub zásadní. Díky těmto houbám a jejich životní strategii nedochází k zahlcení terestrického ekosystému odumřelou biomasou. Zastupují tak funkci primárních rozkladačů mrtvé biomasy (Klán, 1989).

Vztah organismů, který je vzájemně prospěšný pro oba partnery je označován jako vztah symbiotický. V případě interakce houby s řasou či sinicí se jedná o tzv. lichenismus. Pokud je houba v symbiotickém vztahu s kořeny rostlin, jedná se o mykorhizní symbiózu (Klán, 1989). Mykorhizní houby, jako obligátní symbionti, mají přístup k asimilovanému uhlíku od

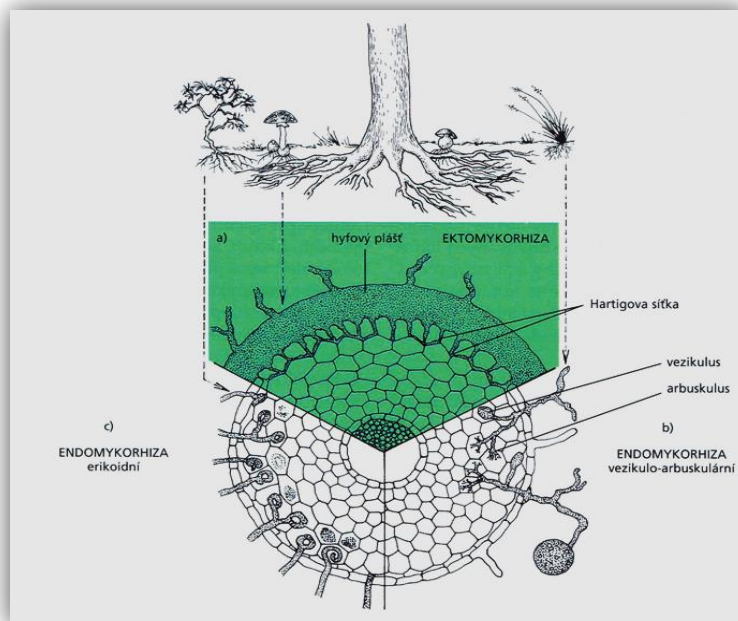
svého hostitele, od kterého získávají energii (Hobbie, 2006). Na oplátku poskytují své hostitelské rostlině potřebné živiny z půdního prostředí (Smith a Read, 1997).

Druhy, které napadají pletiva živých rostlin či tkáně živočichů a způsobují onemocnění, patří mezi druhy patogenní (Klán, 1989).

2.3.1 Mykorrhizní symbióza

Jedná se o symbiotický vztah rostlin a hub, kdy heterotrofní houby získávají externí uhlík jako zdroj energie pro jejich buněčné pochody právě od hostitelské rostliny (Frank, 2005). Rozdělení mykorrhizní symbiózy je založeno především na morfologických znacích (Redecker *et al.*, 2000), podle kterých se dělí na dva nejrozšířenější typy (Obr. 3):

- Endomykorrhizní symbióza
- Ektomykorrhizní symbióza (ECM)



Obrázek 3: Rozdělení mykorrhizní symbiózy: ECM a endomykorrhizní (arbuskulární a erikoidní) symbióza (Lesnická práce, 2008).

U endomykorrhizní symbiózy hyfy hub pronikají přes buněčnou stěnu rostlin, cytoplasmatická membrána však zůstává neporušená. Kolonizovány jsou buňky rhizodermis a buňky primární kořenové kůry. Houba neproniká do cévních svazků kořene ve středním

válci (Gryndler *et al.*, 2004). K tomuto typu patří například arbuskulární mykorhizní symbióza, která vytváří uvnitř kolonizovaných buněk charakteristické útvary - arbuskuly (Gryndler *et al.*, 2004; Finlay, 2008). Pro rostliny řádu *Orchideales* je typická orchideoidní mykorhizní symbióza s dvojitou kolonizací a tvorbou smotků, závitů uvnitř buněk. Dalším typem je erikoidní mykorhizní symbióza, vyskytující se u rostlin řádu *Ericales*, která je typická pro biotopy s nízkým obsahem minerálních živin (Gryndler *et al.*, 2004).

V případě ECM symbiózy houba do vnitřních prostor buněk svého hostitele neproniká. ECM je charakteristická přítomností hyfového pláště na povrchu kolonizovaných kořenů a v mezibuněčných prostorech epidermálních a kortikálních pletiv kořene, kde se z přítomných hyf utváří tzv. Hartigova síť (viz 2.3.2. Ektomykorhizní houby; Wallander *et al.*, 2001).

2.3.2 Ektomykorhizní houby

Ektomykorhizní (ECM) houby jsou v půdním prostředí propojené s kořenovým systémem rostlin a představují jeden z mnoha typů mykorhizní symbiózy – ektomykorhizní symbiózu. Hyfy hub pronikají pouze do mezibuněčných prostor svého hostitele mezi buňky primární kořenové kůry a buňky rhizodermis (kořenové pokožky) a vytvářejí tzv. Hartigovu síť. Spleti hyf na povrchu kořene vytvářejí kompaktní hyfový plášť, který zajišťuje primární mechanickou bariéru (Gryndler *et al.*, 2004) a zvyšují toleranci vůči těžkým kovům (Pb, Ni, Zn, As a Cd), které se v něm mohou akumulovat (Gabriel *et al.*, 1997). V rámci ochrany svého hostitele byla také detekována produkce řady látek, které mají antibiotické a antimykotické účinky (Krupa a Fries, 1971) a také látky ovlivňující jiné organismy na základě produkce rostlinných hormonů (Gogala, 1991).

K dalším funkcím patří snadnější přísun vody a živin. Zajišťují také přísun dusíku (Martin, 1985; Chalot a Brun, 1998), fosforu a stopových prvků, které jsou pro život rostliny limitující a tedy nezbytné (Smith a Read, 1997; Gryndler *et al.*, 2004). Rostliny na oplátku houbám poskytují asimilovaný uhlík, na kterém jsou houby od svých hostitelských rostlin zcela závislé (Garbaye, 1994; Frey-Klett a Garbaye, 2005).

Kolonizace rostliny začíná po klíčení spor hub (askospory, bazidiospory) v blízkosti kořene. Následně dochází k signalizaci mezi rostlinou a houbou, která je doprovázena hormonálními změnami u obou symbiontů. Ty se projevují například tím, že hostitelská

rostlina podporuje růst krátkých postranních kořenů a produkuje látky, které tlumí její obranné mechanismy. Hyfy hub tedy mohou prorůstat špičkou kořene a šířit se po celém jeho povrchu, tak vzniká hyfový plášť (Gryndler *et al.*, 2004), kde hustota přítomných hyf je nejvyšší právě kolem špiček kořene (Horan *et al.*, 1988).

Houby produkují enzymy, které působí na střední lamelu buněčných stěn, ta se následně rozpouští a pomocí mechanického tlaku hyf dochází k oddalování buněk. Tímto mechanismem v kořenové kůře postupně vzniká tzv. Hartigova síť. Za dovršení životního cyklu hub se považuje fruktifikace - vznik plodnic. Plodnice však představuje jen část celého organismu (Gryndler *et al.*, 2004). V okolí kolonizovaného kořene zůstává síť hyf ECM hub. Tímto způsobem je zajištěno propojení s okolní půdou a dalšími organismy, které zde žijí (Horan *et al.*, 1988).

ECM symbióza byla původně považována za parazitismus. Později byl její význam přehodnocen a roku 1885 byla popsána A. B. Frankem jako mykorhizní symbióza (Frank, 2005).

Na základě molekulární fylogenetické studie bylo zjištěno, že ECM vznikla ze svých saprotrofních předků několikrát nezávisle na sobě (Tedersoo *et al.*, 2010a) přibližně před 130-180 miliony lety (Hibbett *et al.*, 2000). Tato životní strategie se zdá být celkem nestabilní - původně saprotrofní bazidiomycety přecházely k symbiotickému způsobu života. Docházelo však i ke ztrátám těchto symbiotických vlastností a návratu k saprotrofii (Gryndler *et al.*, 2004).

2.3.3 Složení společenstva hub v lesní půdě

V půdním prostředí představují mikroorganismy významnou součást živé biomasy. Jedná se přibližně o 10^3 až 10^4 kg na jeden hektar půdy (Fierer *et al.*, 2007), kde významnou složkou jsou právě houby (Bailey *et al.*, 2002).

Pro samotný výskyt hub, jak z hlediska zastoupení biomasy, tak z hlediska druhového rozložení je charakteristická jejich vertikální stratifikace. Rozložení hub je ovlivněno půdním profilem. Horizonty půdního profilu jsou různě provzdušněné, je v nich různé zastoupení živin, organických látek a minerálů (Šnajdr *et al.*, 2008). Také byla prokázána stratifikace pro saprotrofní zástupce, kteří se vyskytují především ve svrchních částech půdy, zatím co zastoupení mykorhizních zástupců se zvyšovalo s hloubkou půdy. To koreluje s možností

mobilizace N a jeho následným transportem ke kořenům svých hostitelských rostlin (O'Brien *et al.*, 2005; Lindahl *et al.*, 2007). Na rozdíl od bakterií, které jsou v půdním prostředí distribuovány přes celý ekosystém, je výskyt houbových komunit často prostorově omezen (Baldrian *et al.*, 2012).

Výrazným faktorem, který ovlivňuje složení společenstva hub a množství jejich biomasy, jsou sezónní změny. Ty způsobují, že půda mírného lesa společně s mikrobiální komunitou a komunitou hub je velmi dynamickým prostředím, které se v průběhu roku mění (Rosling *et al.*, 2003). Sezónní dynamika má tak zásadní vliv na biochemické pochody a fungování lesního ekosystému (Voříšková *et al.*, 2014).

Ve vrstvách opadu se mění celkové složení hub a v minerálních vrstvách dochází k výrazným změnám jejich celkové abundance. V hlubších horizontech není působení sezónních vlivů tak výrazné jako v opadu a svrchních organických horizontech (Rosling *et al.*, 2003; Voříšková *et al.*, 2014).

2.4 Houby asociované s kořeny smrku

Na mikrobiální komunitu v půdě a opadu mají zásadní vliv dřeviny, které udávají vlastnosti a charakter půdy, a sice prostřednictvím specifického složení opadu, mrtvé biomasy (převážně rostlinného původu) a kořenovými exsudáty. Tímto způsobem rostliny ovlivňují složení společenstev půdních mikrobů a hub, které se liší v závislosti na druhu dřeviny. Rozdíly byly zaznamenány především při porovnání listnatých a jehličnatých stromů, kde faktory ovlivňující mikrobiální společenstvo byly rozdílné v pH a obsahu základních kationtů v půdě (Prescott a Grayston, 2013).

Byly provedeny studie, které poukazují na silné vazby mezi půdními mikroorganismy a vnějšími faktory, jako je pH, textura, obsah organické hmoty a poměr C/N v půdě (Fierer a Jackson, 2006). V lesním ekosystému však stromy představují významnou dominantu a v procesu rhizodepozice zásadně ovlivňují chemismus půdy svým opadem i exsudáty. Vliv stromů na abundanci mikroorganismů v lesní půdě a především v nově osidlovaných půdách byl pozorován jako signifikantní (Prescott a Grayston, 2013).

Houby asociované s kořeny stromů je možné určit na základě porovnávání sekvencí DNA hub kolonizujících kořenové špičky a sekvencí DNA plodnic. Po roce 1990, díky vývoji

molekulárních metod pro analýzu a identifikaci, byl zaznamenán významný pokrok především v identifikaci ECM hub. Pro ně je typické pohlavní rozmnožování, ale jen malá část z nich je schopna vytvářet výrazné a trvalé plodnice (Tedersoo *et al.*, 2010b).

2.4.1 Ektomykorhizní houby

ECM druhy představují převážnou většinu hub, které jsou asociovány s kořeny lesních dřevin. Vztah je možné hodnotit jako velmi úspěšný, vzhledem k dominanci lesních ekosystémů na severní polokouli, jejichž význam nespočívá pouze v hospodářském využití, ale také v ukládání velkého množství C z atmosférického CO₂ (Nehls *et al.*, 2010). Tento typ symbiomy představuje až 80 % z celkové houbové biomasy a 30 % z celkové biomasy mikroorganismů v lesních půdách (Hogberg a Hogberg, 2002; Wallander, 2006). Účastní se ho více než 6000 druhů ECM hub (Smith a Read, 1997), které od své hostitelské rostliny mohou získávat až polovinu fotosynteticky asimilovaného uhlíku. Toto významné množství se může dočasně ukládat v tzv. sacharidovém zásobníku na rozhraní houba – rostlina ve formě trehalóz či mannitolu. Aby hostitelská rostlina zabránila případnému parazitismu ze strany symbiotické mykorhizní houby, je schopna tok sacharidů regulovat a omezovat (Nehls *et al.*, 2010). Na oplátku zajišťují své hostitelské rostlině rozpuštěné a organicky vázané živiny – převážně N, P a stopové prvky (Tedersoo *et al.*, 2010a), které se vyskytují v blízkosti kořene, nebo jsou k němu transportovány prostřednictvím mycelia, kdy přecházejí přes kompaktní hyfový plášť a tedy přes symbiotickou houbu (Ashford *et al.*, 1986).

Příjem živin v boreálních lesích je závislý na symbiotické ECM kolonizující více než 95 % kořenových špiček stromů (Taylor *et al.*, 2000), které jsou v tomto prostředí přizpůsobené nízké dostupnosti N (Nygren *et al.*, 2007). V boreálních lesích se jedná především o organické půdní horizonty, kde se kořeny dřevin a s nimi asociované ECM houby množí nejvíce (Perez-Moreno a Read, 2000; Lindahl *et al.*, 2007). Při hnojení se koncentrace N v půdě může zvýšit 50 až 200krát. Obecná odpověď ektomykorhizních hub na vyšší koncentraci dusíku v půdě však bývá spíše negativní (Pettersson, 1994).

2.4.2 Saprotrofní houby

Zástupci saprotrofních hub jsou považováni za hlavní rozkladače odumřelé rostlinné biomasy v ekosystému boreálních lesů (Klán, 1989), jejich aktivita je významná především v horních vrstvách půdního profilu, kde přispívají k mineralizaci uhlíku a snižují poměr C/N (Lindahl *et al.*, 2002).

U mladých kořenů *Picea abies* byla provedena studie, popisující jejich degradaci vlivem saprotrofního zástupce *Phlebiopsis gigantea*, který v první fázi proniká do epidermálních buněk. K tomu dochází již 3 dny po inokulaci infekčních struktur. Následně dochází ke kolonizaci kortikálních a meristémových buněk tkáně hostitele. Do mezibuněčných prostor se houby dostávají pravděpodobně díky působení extracelulárních hydrolytických enzymů, které produkují (Asiegbu *et al.*, 1996). Zástupci saprotrofních hub jsou schopni produkovat také ligninolytické enzymy (MnP, LiP), které pro ně mohou být charakteristické a jejich detekce může být využita pro nepřímé posouzení činnosti specifických dekompozitorů v půdě (Baldrian, 2008).

2.4.3 Druhy parazitické a patogenní

Tyto druhy hub využívají pro napadení buněčné stěny rostlin často podobné extracelulární enzymatický systém jako saprotrofní zástupci při dekompozici rostlinné biomasy (Blanchette, 1991). Specificky působí na svého hostitele, oslabují jeho obranné mechanismy a mohou způsobit i jeho odumření (Heath, 1991).

K patogenním zástupcům, kolonizujícím smrk patří např. někteří zástupci rodů *Armillaria*, *Heterobasidion*, *Stereum* a *Phlebiopsis* (Asiegbu *et al.*, 1996).

2.5 Dekompozice rostlinné biomasy

V procesu dekompozice jsou složité organické látky přeměňovány na látky anorganické, které přecházejí do okolního prostředí a v průběhu času jsou znovu začleněny do organické formy. Rostlinná biomasa je významným zdrojem C, N, P a dalších prvků, které se v přírodě vyskytují především ve stopovém množství. Díky jejich zpětnému zabudování do organické formy se uzavírají biogeochemické cykly těchto prvků v přírodě, které se tak stávají prakticky nevyčerpatelnými (Klán, 1989).

2.5.1 Houby a bakterie v půdním prostředí

Během přechodu rostlin na souš sehrály mykorrhizní houby významnou roli a tu si také udržely dodnes. Díky schopnosti saprotrofních hub rozkládat obtížně rozložitelné látky odumřelé rostlinné biomasy, jsou houby schopné obsadit i další půdní niky. Obsazení terestrického ekosystému mělo pravděpodobně silný dopad na půdní bakterie. Bakterie jsou jednobuněčné organismy, což je nejvíce odlišuje od vláknitých hub, s kterými soutěží o snadno rozložitelný substrát (de Boer *et al.*, 2005). Zásadní role bakterií v rozkladu látek tak zůstala ve vodním prostředí a sedimentu (del Giorgio a Cole, 1998).

Aby se bakterie vyrovnaly se selekčním tlakem ze strany hub, produkují různé antifungální látky (např. HCN, lytické enzymy a železo - chelatační siderofory; Whipps, 2001; Weller *et al.*, 2002). Houby naopak produkují různá antibiotika, modifikují bakteriální genovou expresi a celkově reagují proti bakteriálnímu antagonismu (Duffy *et al.*, 2003).

Při rozkladu lignocelulózového komplexu se dekompozici celulózy účastní jak houby, tak bakterie. Za aerobních podmínek se jí účastní jak houby z oddělení Ascomycota a Basidiomycota, tak i některé půdní bakterie (např. *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*) za anaerobních podmínek se na rozkladu celulózy podílejí z velké části obligátně anaerobní bakterie, např. *Acetivibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus* (Lynd *et al.*, 2002).

Degradace ligninu je zprostředkována především vlivem hub a působení bakteriální komunity je zcela zanedbatelné (Tuomela *et al.*, 2000; Kirk a Farrell, 1987).

Obecně je v kyselých půdách příspěvek hub v dekompozici látek výrazně vyšší ve srovnání s bakteriemi. To je dáno jejich osmotickou tolerancí vůči stresu právě ve srovnání s většinou bakterií (Griffiths *et al.*, 1999).

2.5.2 Enzymy hub podílející se na degradaci rostlinné biomasy

Celulóza, hemicelulóza a lignin představují hlavní biopolymery rostlinné biomasy a také hlavní zdroj živin a energie pro půdní mikroorganismy, produkující extracelulární enzymy, které jsou nezbytné v procesu dekompozice tohoto lignocelulózového komplexu (Baldrian, 2008).

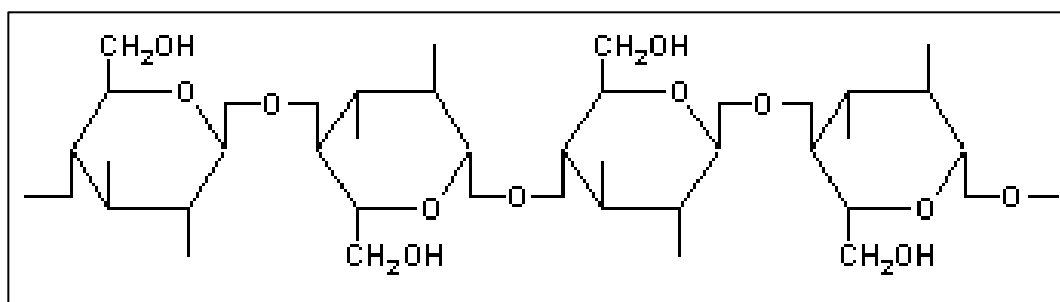
Hydrolytické enzymy, účastníci se rozkladu celulózy a hemicelulózy, zajišťují uvolňování C a jeho následné využití pro růst mycelia v půdě. Rozkladem celulózy a hemicelulózy tak dochází k uvolnění energie, která je dále využívána. Mikroorganismům jsou však k dispozici převážně v lignocelulózovém komplexu. Přístup k nim je možný až po působení ligninolytických enzymů, které tyto polysacharidy uvolňují z kovalentních vazeb s ligninem (Baldrian, 2008; Baldrian a Valášková, 2008). Další hydrolytické enzymy, jako fosfatáza, arylsulfatáza a peptidáza, působí na organické látky obsahující N, P a S, které jsou také dodávány do mycelia hub (Baldrian, 2009b).

Přehled enzymů podílejících se na mobilizaci živin, N, P, S a na degradaci biopolymerů je uveden v Tab. 1 (Baldrian, 2009a).

Tabulka 1: Přehled enzymů. Enzymy podílející se na degradaci biopolymerů a mobilizaci živin z lignocelulózového komplexu (upraveno dle Baldrian, 2009a).

Složky lignocelulózového komplexu	Enzymy podílející se na jejich degradaci
Celulóza	endoglukanáza, celobiohydroláza, β -glukosidáza
Hemicelulóza	endoxylanáza, endomannanáza, β -glycosidáza, esteráza
Jiné polysacharidy	endochitináza, N-acetylglukosamidáza, α -glucosidáza
Lignin	Mn-peroxidáza, lignin peroxidáza, lacáza (fenoloxidáza), H_2O_2 produkující enzymy
Získávání N	proteáza, aminopeptidáza, ureáza
Získávání P	fosfomonoesteráza, fosfodiesteráza
Získávání S	arylsulfatáza

Celulóza (Obr. 4) představuje 30 – 50 % suché hmotnosti rostlin a je tak nejrozšířenější organickou sloučeninou na Zemi. Rozklad tohoto polymeru může probíhat jak za aerobních tak i anaerobních podmínek a podílejí se na něm extracelulární celulázy. Jedná se o enzymové systémy, které se během synergických procesů podílejí na postupné přeměně celulózy na glukózu (Lynd *et al.*, 2002;).



Obrázek 4: Celulóza - lineární řetězec celulózy je složený z více jak 10 000 zbytků molekul D-glukózy s β -1,4 vazbou (Lynd *et al.*, 2002; převzato z: <http://www.oskole.sk>).

Celulázy jsou rozděleny do různých skupin enzymů, naznačující konvergentní směr evoluce směrem ke stejnému substrátu (Lynd *et al.*, 2002), a proto i když komponenty celulytického systému půdních mikroorganismů bakterií a hub mají obdobnou funkci, tak z pohledu evoluce jsou příbuzné jen vzdáleně (de Boer *et al.*, 2005).

Tři hlavní typy enzymatických aktivit:

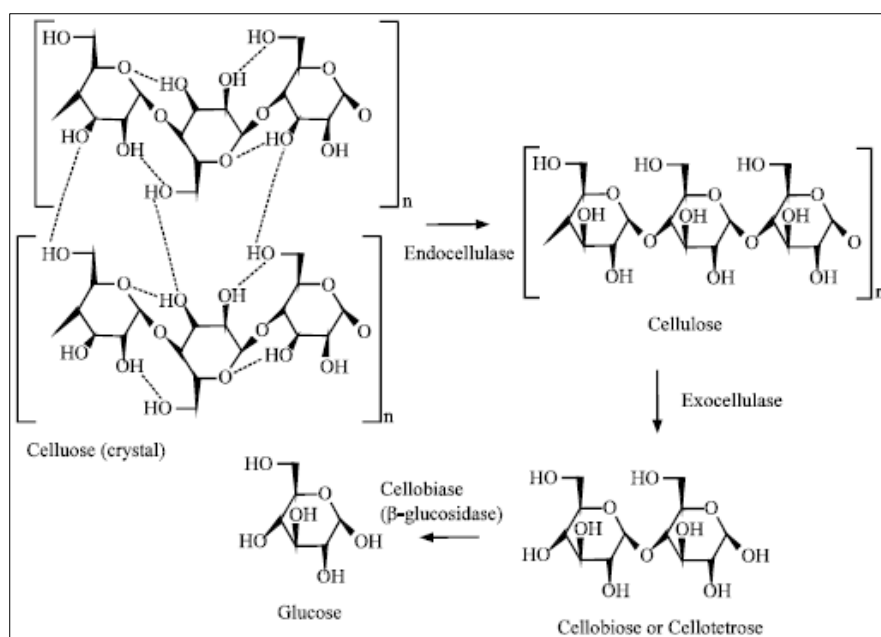
1. Endoglukanázy nebo 1,4,β-D-glukanázy (EC. 3.2.1.4) – enzymy, které z amorfních míst celulózy generují oligosacharidy a v důsledku toho dochází k uvolnění nových konců řetězců.

2. Exoglukanázy včetně 1,4,β-D-glukan-glukosidázy (celodaxtrinázy; EC. 3.2.1.74) a 1,4,β-D-glukan-cellobiohydroláza (celobiohydrolázy; EC. 3.2.1.91) – uvolňují celobiózu z redukčních či neredukčních konců řetězce celulózy.

3. β-glukosidázy (EC. 3.2.1.21) hydrolyzují rozpuštěné celodextriny a celobiózy na glukózu.

Celulózy jsou obecně odlišeny od ostatních glykosidických hydroláz tím, že hydrolyzují β-1,4-glukosidické vazby (Birsan *et al.*, 1998; Withers, 2001).

Všechny tři typy enzymů se koordinovaně podílí na hydrolytickém rozkladu celulózy (Obr. 5; Tomme *et al.*, 1995).



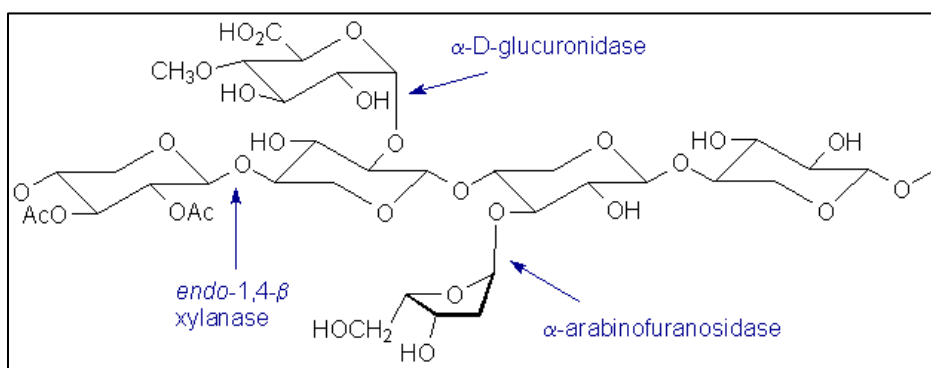
Obrázek 5: Degradace celulózy vlivem hydrolytických enzymů (převzato z Karmakar a Ray, 2011).

Důležitou součástí dekompozičního systému některých hub může být i oxidativní dekompozice, která souvisí se snížením pH a produkcí dvojmocného železa. Pak jsou vytvářeny volné radikály při tzv. Fentově reakci: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot$, které pravděpodobně difundují do buněčných stěn rostlin a způsobují depolymerizaci celulózy (Goodell, 2003).

Hemicelulóza představuje lineární či větvený polymer, který však není schopen vytvářet krystalické struktury. Řetězce jsou výrazně kratší s přibližně 150 – 200 glykosidickými zbytky a často větvené či acetylované (Kirk a Cullen, 1998).

Monosacharidy pospojované v glykosidické β -1,4 vazbě (příležitostně β -1,3; β -1,6 nebo α -1,4 vazba) jsou: D-xylóza, D-glukosa, D-mannosa, D-galaktosa, L-arabiosa, D-galakturonová kyselina, D-glukuroniová kyselina, 4-O-methyl-glukuroniová kyselina (Pérez *et al.*, 2002).

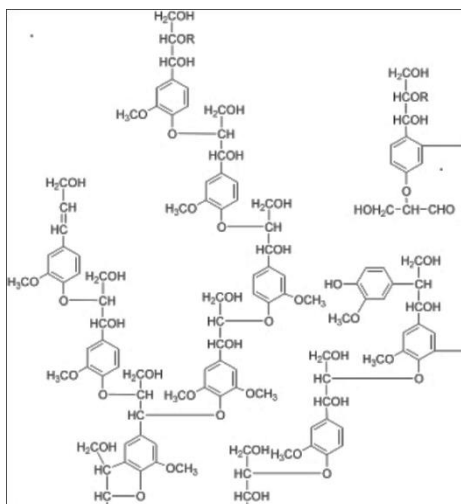
Pro rozklad hemicelulóz je nutná kooperativní aktivita více typů hydrolytických enzymů (Obr. 6). V případě xylanu dochází ke štěpení hlavního řetězce enzymem endoxylanázou. Acetylové skupiny jsou odštěpovány enzymem acetylxylan esterázou.



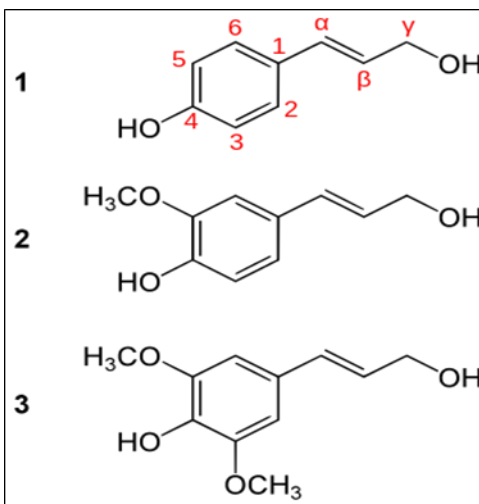
Obrázek 6: Enzymy účastníci se rozkladu hemicelulózy. Pro rozklad hemicelulózy je nutná kooperace více typů degradačních enzymů. (převzato z <http://chemistry.umeche.maine.edu>).

Vzniklé kratší fragmenty řetězců mohou být štěpeny enzymem xylosidázou, který působí stejně jako endoxylanáza, ale jen na kratších fragmentech. Pro degradaci arabinoxylanu u jehličnatých stromů je potřeba enzym α -arabinosidáza. Degradace glukomananů probíhá podobně. V prvním kroku působí endomananáza a dále acetylmanan esteráza, který odstraňuje acetylové skupiny z bočního řetězce. Enzym α -galaktosidáza odštěpuje z bočního řetězce galaktózu. Oligosacharidy jsou štěpeny β -manosidázou a β -glukosidázou (Kirk a Cullen, 1998).

Lignin je další významnou komponentou lignocelulózového komplexu (Obr. 7a). Je to rozvětvený, aromatický polymer složený z fenylpropanových derivátů: konyferylalkoholů, p-kumarylalkoholů a sinapylalkoholů (Pérez *et al.*, 2002).



Obrázek 7a: Schématický vzorec molekuly ligninu (převzato z <http://www.ibwf.de>).



Obrázek 7b: Podjednotky ligninu. **1.** konyferylalkohol, **2.** p-kumarylalkohol **3.** sinapylalkohol

Podjednotky ligninu jsou spojené C-C a C-O-C vazbami (Obr. 7b). Účinné ligninolytické enzymy nejsou hydrolytického, ale oxidativního charakteru a patří do skupiny oxidoreduktáz (Kirk a Cullen, 1998).

Jedná se o peroxidázy, oxidázy a enzymy produkující vodík. Patří sem ligninová peroxidáza (LiP), manganová peroxidáza (MnP) a verzatilní peroxidáza (VP). Ty využívají jako kofaktor extracelulární H_2O_2 . Dalším enzymem je ligninolytická oxidáza (lakáza), která oxiduje svůj substrát (lignin) přímo (Tien a Kirk, 1983). Rozklad ligninu je rozšířen především mezi bazidiomycety (Tuomela *et al.*, 2000).

V dnešní době je technicky možné měřit aktivitu těchto extracelulárních enzymů a tímto způsobem kvantifikovat procesy, které se podílejí na degradaci rostlinné biomasy a posléze koloběhu a mobilizaci živin, včetně N, P a S (Baldrian, 2009a).

Některé enzymy jsou produkovány širokým spektrem půdních mikroorganismů. Jiné, jako například výše uvedené ligninolytické peroxidázy, mohou indikovat přítomnost specifických mikrobiálních taxonů (Baldrian, 2009a).

2.5.3 Dekompoziční schopnosti saprotrofních hub

Fosilní nálezy a údaje molekulární biologie potvrzují, že hlavních skupiny saprotrofních hub (oddělení Basidiomycota, některé Ascomycota a Zygomycota) pocházejí z Glomeromycot. Z hlediska jejich životní strategie je pro kolonizaci půdního prostředí a schopnost penetrace tkání cévnatých rostlin výhodný a pro tyto zástupce také typický vláknitý růst. (Berbee a Taylor, 1993; Selosse a Le Tacon, 1998). Obecně se jedná o druhy s ruderálními vlastnostmi. Produkují velkého množství spor, jsou schopné rychlého růstu pro rychlé obsazení substrátu, který kolonizují. Také jsou schopné využít relativně jednoduché uhlíkaté sloučeniny (Newsham *et al.*, 1995) zabudované v lignocelulózovém komplexu, ve kterém celulóza a hemicelulóza představují hlavní zdroj energie. Tyto polysacharidy jsou však v rostlinných tkáních zabudovány s jen obtížně rozložitelným ligninem, a aby byl zajištěn přístup k těmto polysacharidům, je potřeba také degradace ligninu (viz 2.5.2. Enzymy hub podílející se na degradaci rostlinné biomasy).

Dekompoziční schopnosti saprotrofních hub jsou dány účinným enzymatickým systémem ligninolytických bazidiomycet (Kirk a Farrel, 1987) a saprotrofních zástupců Xylariaceae z oddělení Ascomycota (Worrall *et al.*, 1997).

Schopnost produkce enzymů, které se účastní dekompozičních procesů lignocelulózového komplexu, je determinována ekofyziologickými vlastnostmi a taxonomickým zařazením hub (Eichlerová *et al.*, 2015).

Zdá se, že řada genů je v genomech hub obecně rozšířena a že různá enzymatická aktivita je dána rozdílností v expresi genů na stejném substrátu (Baldrian, 2006; Baldrian a Valášková, 2008). Také přítomnost několika genů, kódujících enzymy stejné funkce, v jednom genomu je velmi rozšířená. Rozdíly mezi houbami jsou proto obvykle spíše na úrovni aktivity enzymů než jejich přítomnost či nepřítomnost (Eichlerová *et al.*, 2015).

Zástupci saprotrofních hub spadají převážně do oddělení Basidiomycota, Ascomycota a také pododdělení Mucoromycotina a Mortierellomycotina. Obecně je u těchto saprotrofů detekována aktivita kyselé fosfatázy, β -glukosidázy a N-acetylglukosamidázy. Jiné enzymy, jako hemicelulóza a lakáza v takové míře zaznamenány nejsou. Nejvyšší aktivitu veškerých enzymů, s výjimkou alkalické fosfatázy, α -glukosidázy, α -mannosidázy, α -fukosidázy, N-acetylglukosamidázy zpravidla vykazují zástupci hub z oddělení Basidiomycota (Eichlerová *et al.*, 2015).

Houby s dekompozičními vlastnostmi lze dělit na základě schopnosti rozkladu jednotlivých složek rostlinné biomasy a produkce extracelulárních enzymů. Basidiomycety, které představují dominantní část saprotrofních zástupců, obecně spadají do skupiny celulolytických hub, které způsobují hnědou hnilobu (brown rot – BR; Eichlerová *et al.*, 2015). Jedná se o houby degradující celulózu a produkující extracelulární glykosidické hydrolázy (především hemicelulázy, 1,4- β -endoglukanázy) a jsou schopné způsobit rychlou depolymeraci celulózy. Také u nich byla zaznamenána produkce Fe-reduktáz, chinon reduktáz a strukturně odlišné oxidázy podílející se na extracelulární tvorbě Fe^{2+} a H_2O_2 právě v souladu s Fentovou reakcí, při které dochází ke vzniku hydroxylových radikálů. Jedná se o vysoce reaktivní oxidační činidla, která jsou schopna depolymerizovat celulózu. Houby hnědé hniloby se pravděpodobně vyvinuly z hub způsobujících bílou hnilobu (white rot - WR), které jsou schopné rozkládat nejen celulózy a hemicelulózy, ale také lignin (Martinez *et al.*, 2009). Houby bílé hniloby degradují lignin až na CO_2 a H_2O_2 na rozdíl od hub hnědé hniloby, které jsou schopné lignin jen částečně modifikovat (Niemenmaa *et al.*, 2007). Dá se říci, že houby bílé hniloby jsou značně závisle na svých extracelulárních oxidačních enzimech, peroxidázách a lakázách (Baldrian a Valášková, 2008).

Dále se také saprotrofní houby účastní rozkladu lignocelulóзовého materiálu obsaženého v opadu (litter decomposing fungi, LDF), kde je zajištěn rozklad biomasy díky vysoké produkci hemiceluláz, podobně jako u hub bílé hniloby a saprotrofních ascomycet (Eichlerová *et al.*, 2015).

Saprotrofní ligninolytické houby řazené do oddělení Basidiomycota mívají v porovnání se saprotrofy z oddělení Ascomycota silnější degradační schopnosti zejména β -glukuronidáz a β -galaktosidáz (Steffen *et al.*, 2007; Valášková *et al.*, 2007). Význam bazidiomykot, jako silných saprotrofů potvrzují i mnohé studie, ve kterých byla prokázána rychlejší ztráta hmoty právě v důsledku působení bazidiomykot oproti askomykotům (Osono a Takeda, 2002). Rozdíly mohou být vysvětleny přítomností ligninolytických peroxidáz (Li-peroxidáza, Mn-peroxidáza a obecné peroxidázy) u bazidiomykota a jejich nepřítomnost u askomycota (Martinez *et al.*, 2005).

V genomech saprotrofních hub byly objeveny geny kódující extracelulární enzymy účastnící se degradace rostlinné biomasy, avšak přítomnost či nepřítomnost určitého genu není vždy spolehlivým ukazatelem metabolického potenciálu daného druhu houby (Eichlerová *et al.*, 2015).

2.5.4 Dekompoziční schopnost ektomykorhizních hub

I přes to, že ECM houby jsou obecně považovány za organismy, které jsou závislé na příjmu uhlíku od svých hostitelských rostlin, tak otázka týkající se jejich potenciálu získávat uhlík přímo z půdního prostředí byla opakovaně předmětem studií (Norkrans, 1950). Stále existují studie, kde se autoři zabývají důkazy týkající se saprotrofního způsobu života ECM hub (Courty *et al.*, 2007; Cullings *et al.*, 2008).

Teorie týkající se ECM hub a jejich potencionálního saprotrofního způsobu života jsou založené především na zvýšení enzymatické aktivity během období, kdy je nízký příděl fotosyntátů ze strany hostitelských rostlin a úzce souvisí s otázkou, která se týká významu ECM hub na koloběh uhlíku v ekosystému. Existují však teorie, které jejich saprotrofní vlastnosti z části negují a kde jejich význam ohledně zisku uhlíku se zdá být v hlubších horizontech spíše nevýhodný především z pohledu nízkého energetického zisku. Dále je poukazováno na to, že schopnost těchto organismů produkovat celulolytické a ligninolytické enzymy je v porovnání se saprotrofními zástupci výrazně nižší, což bylo také potvrzeno nízkou abundancí odpovídajících genů v sekvenovaných genomech ECM hub *Laccaria bicolor*, *Amanita bisporigenees* ve srovnání se saprotrofními zástupci (Baldrian, 2009b). V souvislosti s tím jsou důkazy o saprotrofním původu ECM hub, které ztratily genetickou schopnost degradace organického materiálu v průběhu evoluce (Plett a Martin, 2011). Někteří ECM zástupci se chovají výhradně jako symbionti, jiní mají spíše saprotrofní způsob získávání živin, kdy C a N získávají především z mrtvé biomasy rostlin. Míra, jakým způsobem houba získává živiny z mrtvé biomasy nebo od hostitelské rostliny je druhově specifická (Zeller *et al.*, 2007). Mnoho ECM hub produkuje extracelulární enzymy oxidačního a celulolytického charakteru. (Bending a Read, 1995). Mnohé studie také odhalily produkci lakázy, β -glukosidázy, celobiohydrolázy (Courty *et al.*, 2005; 2006; Buée *et al.*, 2007) a z kořenových špiček ECM byla detekována i aktivita enzymu fosfatáza (Jentschkeho *et al.*, 2001). Působením tohoto enzymu jsou do půdního prostředí uvolňovány orthofosforečnanové ionty, představující jedinou možnou formu P, kterou jsou rostliny a mikroorganismy schopné přijmout (Rao *et al.*, 1996).

Zvýšení enzymatické aktivity ze strany ECM hub bylo zaznamenáno např. po defoliaci a tedy snížení schopnosti fotosyntézy hostitelské rostliny. Aktivita byla měřena u ECM špiček a bylo zaznamenáno uvolnění monosacharidů a oxidace fenolů. Proto se zdá, že příděl asimilovaného uhlíku ECM houbám má vliv na aktivitu jejich extracelulárních enzymů.

Ve studii Courty *et al.*, (2007) byla při snížení fotosyntetické aktivity zaznamenána zvýšená aktivita enzymů glukuronidázy, celobiohydrolázy, β -glukosidázy a lakázy. Aktivita pro enzym fosfatázu však zaznamenána nebyla (Buée *et al.*, 2005; Mosca *et al.*, 2007).

Další hypotézy, související se snížením toku asimilátů a nárůstem enzymatické aktivity, se týkají indukce autolytických procesů v ECM houbovém myceliu, případně útoku na odumírající hostitelskou tkáň pro možnost útěku z umírajícího kořene. Tak mohou symbiotičtí ECM zástupci vyhledávat nového hostitele (Baldrian, 2009b).

Studie Courty *et al.*, (2007) a Cullings *et al.*, (2008) poukazují na zvýšené hladiny extracelulárních enzymů β -glukosidázy a celobiohydrolázy produkovaných zástupci ECM i v případě neomezené dodávky fotosyntátů. Produkce těchto enzymů ECM houbami může být důsledkem přítomnosti vzácných substrátů vyskytujících se v blízkosti kořene. Tím je zajištěn jejich rozklad a následný příjem houbami (Baldrian a Valášková, 2008). Proto se také zdá, že houby jsou schopny různé exprese genů pro enzymy v různých částech mycelia (Baldrian, 2009b). Např. za normálních podmínek, kdy ECM má zajištěný příjem uhlíku od svého hostitele, je příjem P zajišťován výhradně mimokořenovým myceliem. Naopak v případě infekce hostitelské tkáně rostlin docházelo k nárůstu aktivity β -glukosidázy (Krause a Kothe, 2006), kterou jsou schopné produkovat mnohé ECM houby (Baldrian a Valášková, 2008). Pro některé ECM - *Russula spp*, *Xerocomus spp* a *Lactarius spp* (Luis *et al.*, 2005) byla zaznamenána produkce i ligninolytického enzymu lakáza. Avšak produkce Mn-peroxidáza a Li-peroxidáza zaznamenána nebyla (Baldrian, 2006).

Vzhledem k tomu, že přítomnost mykorhizních hub je více charakteristická pro hlubší horizonty než pro saprotrofní houby, tak přítomnost těchto enzymů v hlubších horizontech může být částečně dána právě aktivitou ECM hub (Šnajdr *et al.*, 2008b).

2.6 Půda a kořen po ukončení toku asimilátů

Kořeny dřevin uvolňují do svého bezprostředního okolí kořenové exsudáty obsahující asimilovaný uhlík, který je dodáván půdním mikroorganismům (Courty *et al.*, 2010a). Jedná se především o ECM houby, které představují až 1/3 z celkové mikrobiální komunity (Högberg a Hogberg, 2002). V případě odumírání stromu dochází ke snížení toku těchto asimilátů a dochází tak k úbytku původně snadno dostupného uhlíku. Ten je stále přítomen, ale již v obtížněji dostupné formě polymerů rostlinné biomasy (Štursová *et al.*, 2014), kterou představují především mrtvé kořeny rostlin (Mosca *et al.*, 2007).

V hlubších půdních horizontech se vyskytují především ECM houby, zatímco saprotrofní zástupci jsou zde méně konkurence schopní a dominují ve svrchních vrstvách a opadu (Lindahl *et al.*, 2007). Následně dochází k degradaci rostlinné biomasy. Tento proces je katalyzován enzymy s různou aktivitou, která stoupá v důsledku snížení dodávky asimilátů ze strany hostitelské rostliny. Enzymy jsou produkovány jak ECM, tak saprotrofními druhy (Baldrian, 2009b)

Zástupci ECM hub produkují poměrně širokou škálu enzymů. Díky tomu jsou celkem variabilní skupinou půdních mikroorganismů, které jsou schopné se rychle přizpůsobovat měnícím se podmínkám (Talbot *et al.*, 2008). Je možné, že ECM zástupci zahajují degradační procesy odumírajících kořenů, kdy vlivem svých enzymů rozkládají polymery rostlinné biomasy a získané živiny, které dále využívají pro růst svého extramatrikálního mycelia s cílem nalézt nového hostitele. Tento model koreluje se zaznamenaným nárůstem aktivity enzymu fosfatáza (Cullings *et al.*, 2008).

U abundantně zastoupených ECM hub asociovaných s kořeny dřevin byla detekována aktivita enzymů a byla potvrzena schopnosti degradace rostlinných polymerů (Mosca *et al.*, 2007). K těmto ECM houbám patří *Russula*, *Tomentella*, *Xerocomus* a v hlubších horizontech *Cenococcum*, u kterých byla detekována aktivita enzymů β -xylosidáza, β -glukuronidáza, β -glukosidáza, N-acetyl-glukosamidáza. U výše zmíněných druhů byla také zaznamenána aktivita pro enzym lakáza s výjimkou ECM zástupce *Tomentella* (Courty *et al.*, 2010b). U ECM zástupců *Russula spp.*, *Xerocomus spp.* a *Lactarius spp.* byla zaznamenána aktivita pro enzym degradující lignin (Luis *et al.*, 2005). Při rozkladu byla také detekována aktivita enzymů, které jsou typické pro saprotrofní zástupce. Enzymy celobiohydroláza, glukuronidáza a xylosidáza, které se účastní degradace celulózy a hemicelulózy BS rostlin (Mosca *et al.*, 2007). Po ukončení toku asimilátů dochází v půdním prostředí k nárůstu

enzymatické aktivity enzymů α -glukosidázy, β -glukosidázy, β -xylosidázy, které se účastní degradace rostlinné biomasy a dále fosfatázy a NAGázy. Ke snížení aktivity těchto enzymů dochází až po 3 letech po ukončení toku asimilátu a to až na 20 – 50 % z původní enzymatické aktivity. Enzymy endoceluláza, endoxylánáza, lakáza a Mn-peroxidáza, potřebné pro degradaci obtížněji rozložitelných polymerů, byly nejvíce aktivní první 2 roky po ukončení toku asimilátů. Byl zaznamenán úbytek původně dominantně zastoupených Basidiomycot a nárůst zástupců z oddělení Ascomycot a Mortierelomycotina (Štursová *et al.*, 2014).

Pochopení časoprostorové dynamiky jakým způsobem saprotrofní a mykorhizní zástupci spolu interagují v dekompozičních a tedy recyklačních procesech C a živin v půdě a opadu je stále do jisté míry omezeno (Lindahl *et al.*, 2007).

3 Cíle práce

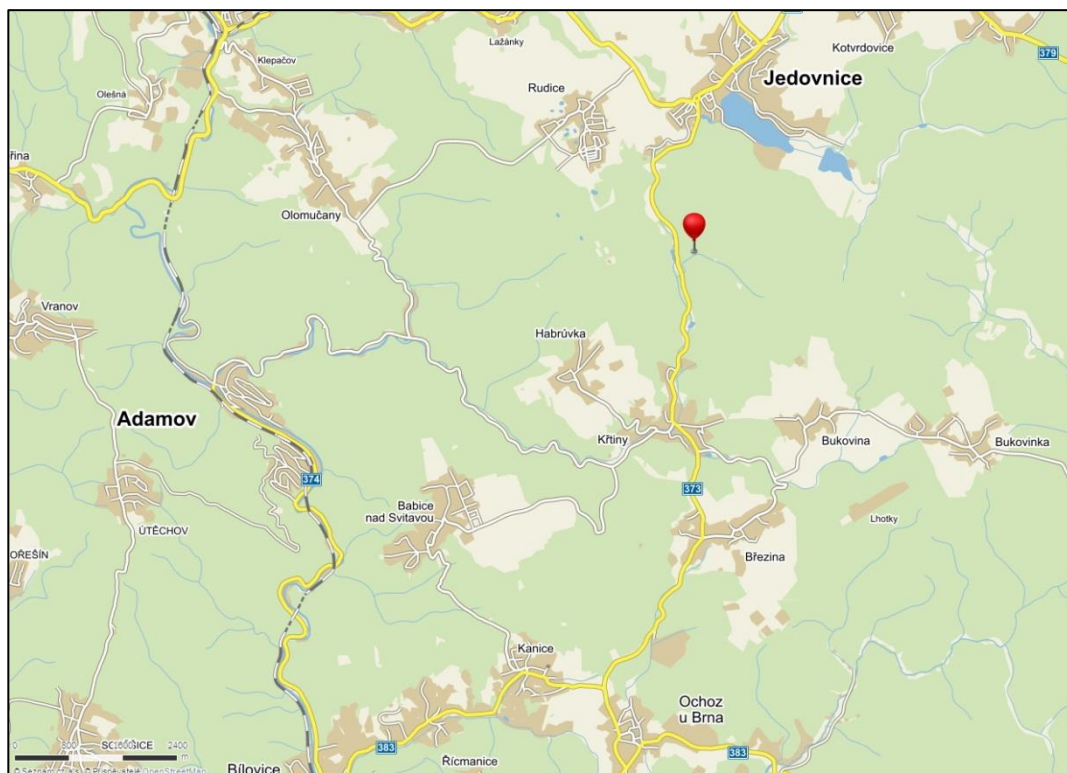
Cílem diplomové práce bylo porovnat složení společenstva hub v kořenech, rhizosféře a okolní půdě smrku ztepilého (*Picea abies*) jednak v živém porostu, jednak v různých časových intervalech po ukončení toku uhlíku v důsledku vykáčení porostu. Dále byla sledována biomasa hub a aktivity extracelulárních enzymů a její změny v příslušných kompartmentech.

Dalším cílem bylo charakterizovat abundantně se vyskytující zástupce v kořenech, rhizosféře a okolní půdě a popsat jejich postupný vývojový trend po ukončení toku asimilátů a izolovat a charakterizovat dominantně se vyskytující saprotrofní houby v kořenech smrku ztepilého, které je možné izolovat a kultivovat v čistých kulturách. U těchto hub byla na základě detekce enzymů posouzena jejich úloha v rozkladu kořenů.

4 Materiál a metodika

4.1 Studovaná lokalita

Pro odběr vzorků byl vybrán Školní lesní podnik Masarykův les Křtiny, který byl založen v roce 1923 a představuje účelové zařízení Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. ŠLP se nachází severně od Brna a zahrnuje komplex více než 10 000 ha smíšeného lesa. Průměrné roční teploty se pohybují kolem 7,5 °C, úhrn srážek za rok činí 520 až 680 mm (Kantor *et al.*, 2002). Místem odběru byl porost smrku ztepilého (*Picea abies*) s ojedinělými buky do 10 let věku, nacházejících se mezi Jedovnicí a Křtinami (GPS souřadnice 49.3197664N, 16.7480700E; Obr. 8).



Obrázek 8: Místo odběru – Křtiny – hájovna Na lukách (<http://mapy.cz>).

4.2 Představení experimentu

První experiment

Předmětem práce bylo porovnat složení společenstva hub v kořeni (K) a v rhizosféře (R) smrku ztepilého (*Picea abies*) a v jeho okolní půdě (B - bulk soil). Dále po ukončení toku asimilátů (pokácení stromů) popsat změny společenstva hub ve výše zmíněných kompartmentech. Vzorky byly odebírány v období duben 2013 až červen 2014.

Po každém odběru byly K, R a B od sebe odděleny a lyofilizovány. Následně byla izolována DNA hub a bylo provedeno sekvenování na platformě Illumina MiSeq. Stanovení houbové biomasy proběhlo na základě měření obsahu ergosterolu, stanovení aktivity extracelulárních enzymů bylo provedeno spektrofotometricky. U vybraných vzorků bylo stanoveno pH a obsah C a N.

Druhý experiment

U pokácených stromů byly odebrány kořeny pro izolaci čistých kmenů hub a jejich charakterizaci. Izoláty byly identifikovány na základě sekvenace DNA a byla stanovena aktivita vybraných extracelulárních enzymů. Odběry vzorků pro tento experiment byly provedeny dva (listopad 2013 a březen 2014), tedy 5 měsíců a 9 měsíců po ukončení toku asimilátů.

4.3 Odběr vzorků

První experiment

V dubnu 2013 bylo vybráno 10 stromů, které byly označeny blízko báze. Fotografickou dokumentací a zakreslením do mapky tak, aby bylo později možné identifikovat vybrané stromy i po jejich pokácení (Obr. 9, 10). Okolo středu kmene stromu nebo pařezu bylo při každém odběru vymezeno mezikruží o poloměru 2 – 2,5 m. V rámci mezikruží bylo odebráno vždy 5 trubic (průměr 4,5 cm, délka 25 cm), které tvořily společný vzorek pro každý strom. Vzorky byly odebrány z vrchních 10 cm půdního profilu (bez opadu). Materiál z kompozitního vzorku byl rozdělen na jemné kořeny smrku (< 2 mm), jejich rhizosféru a okolní půdu následně:

Směsný vzorek byl přeseť přes 5mm síto. V průběhu tohoto přesévání byly vybírány kořeny. Přeseťím byl získán vzorek půdy (B). Vybrané kořeny stromu byly mechanicky očištěny a oklepány od zbylé půdy, která představovala rhizosféru (R). Následovalo promytí kořenů v dH₂O a jejich nastříhání na cca 0,5 cm (K). Takto připravené vzorky byly umístěny do předvážených sterilních 50ml zkumavek, ve kterých byly zváženy, zamraženy v -80 °C a lyofilizovány. Po lyofilizaci byly vzorky opět zváženy a byla stanovena jejich suchá hmotnost. Na základě získaných dat byla vypočítána rychlost rozkladu.

Po každém odběru (Tab. 2a) bylo získáno 30 vzorků (10x K, 10x R, 10x B). Odběrů pro první experiment se uskutečnilo celkem 7 a bylo zpracováno 210 vzorků.



Obrázek 9: Duben 2013 – před pokácením stromů

Obrázek 10: Listopad 2013 – po pokácení stromů

Tabulka 2a: Termíny odběru vzorků.

Odběr	Datum odběru	Doba po pokácení/měsíc
1.	Duben 2013	-
2.	Květen 2013	-
	Červen 2013 – pokácení stromů	0
3.	Červenec 2013	1
4.	Srpen 2013	2
5.	Listopad 2013	5
6.	Prosinec 2013	6
8.	Červen 2014	12

Druhý experiment

Pro kultivaci hub z kořenů byly provedeny dva odběry (Tab. 2b). U vybraných, označených stromů (pařezů) odebrány 3 trubice v rámci mezikruží o poloměru 1,5 – 2 m. Z odebrané půdy byly následně vybrané kořeny (< 2 mm) omyty kkH_2O . Následovala kultivace a izolace čistých kmenů hub.

Tabulka 2b: Termíny odběru vzorků.

Odběr	Datum odběru	Doba po pokácení/měsíc
1.	Listopad 2013	5
2.	Březen 2014	9

4.4 První experiment: Izolace celkové DNA z kořenů, rhizosféry a okolní půdy

Extrakce a purifikace DNA představuje kritický krok pro její vysoký výnos a následnou kvalitu výsledků ohledně mikrobiální rozmanitosti. S ohledem k vysokému obsahu huminových kyselin v půdním prostředí (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008), byla pro izolaci houbové DNA z půdy použita jiná metoda než pro izolaci kořenů tak, aby výtěžek DNA ze všech vzorků byl dostatečný. Izolace pro každý vzorek proběhla dvakrát nezávisle na sobě, poté byla přečištěna.

4.4.1 Izolace DNA z kořenů

Genomová DNA z kořínků o navážce 0,15 g byla izolována kitem DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, SRN). Metoda je založen na purifikaci DNA pomocí speciálních mikro-kolonek, které v prvním kroku zachycují proteiny, polysacharidy a nečistoty. Na druhé koloně dochází k zachycení DNA). Před samotnou izolací byly lyofilizované vzorky rozrušeny použitím tekutého N a drcením v porcelánovém hmoždíři tloučkem. Dále se postupovalo dle protokolu dodavatele.

4.4.2 Izolace houbové DNA z rhizosféry a okolní půdy

Pro izolaci houbové DNA z rhizosféry a půdy byla použita modifikovaná metoda SV popsaná autory v práci Sagova-Mareckova *et al.*, 2008. Do sterilní mikrozkušavky se skleněnými kuličkami (0,25 g kuliček s průměrem 0,1 mm a 0,25 g kuliček s průměrem 0,5 mm) bylo přidáno 0,25 g lyofilizovaného vzorku. Dále bylo přidáno 800 μ l extrakčního pufru (50mM NaH₂PO₄ (pH 8), 50mM NaCl, 500mM Tris-HCl (pH 8) a 5% SDS), 200 μ l fenolu (pH 8) a 200 μ l chloroform-izoamylalkoholu (poměr 24:1). Homogenizace směsi byla provedena na FastPrepu (MP Biomedicals, USA) v horizontální poloze 3x20 s. Následovala centrifugace 3 min při 12 200 g. Supernatant byl odebrán do čisté 1,5ml mikrozkušavky a byl k němu přidán fenol (0,5 objemu supernatantu) a chloroformu/izoamylalkoholu (0,5 objemu supernatantu). Směs byla protřepána, stočena 5 min při 6000 g a supernatant znovu přepipetován do nové 1,5ml mikrozkušavky. Dále byl přidán chloroform/izoamylalkohol (1 objem supernatantu) a směs byla znovu důkladně protřepána a stočena 5 min při 6000 g. Následovalo odebrání supernatantu do 2ml mikrozkušavek a přidání 6M NaCl (1/3 objemu supernatantu) a 10% CTAB v 0,7M NaCl (1/10 objemu supernatantu). Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 30 min při 65 °C na termobločku. Po ochlazení směsi byl přidán chloroform/izoamylalkohol (1 objem supernatantu) a následovala centrifugace 20 min při 3400 g. Vzorek byl přepipetován do nových 1,5ml mikrozkušavek, kde došlo k vysrážení směsi izopropanolem (0,6 objemu supernatantu) a 3M octanem sodným pH 4,8 (0,1 objemu supernatantu). Srážení směsi probíhalo 30 minut i déle a vzorky byly dále stočeny 20 min při 12 200 g. Vzniklý supernatantu byl odstraněn a sediment promyt v 200 μ l 70% EtOH. Následovala centrifugace 20 min při 12200 g a odstranění supernatantu, dále vysušení sedimentu v přístroji DNA SpeedVac (Savant, Holbrook) a poté jeho rozpuštění v 50 μ l sterilní dd H₂O.

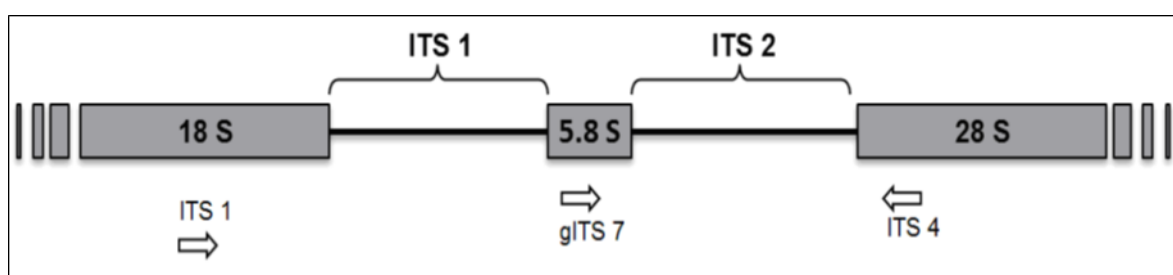
4.4.3 Přečištění izolované DNA z kořenů, rhizosféry a okolní půdy

Izolovaná DNA byla přečišťována pomocí GeneClean Turbo Kit. Před vlastní purifikací byl přidán 1M HEPES/ 1M CaCl₂ (pH 7). Tato směs byla inkubována po dobu 5 minut. Další postup byl proveden dle protokolu výrobce a koncentrace izolované DNA byla změřena na NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Thermo Scientific, USA).

4.5 První experiment: Identifikace hub pomocí PCR a NGS sekvenování

Pro identifikaci hub z izolované a přečištěné DNA byla provedena PCR a analýza sekvencí pomocí sekvenování nové generace.

ITS (International transcribed spacer) představuje dostatečně variabilní oblast sekvence pro rozlišení druhu a zároveň sousedí s vysoce konzervovanými oblastmi ribozomálních podjednotek, které jsou nezbytné pro nasednutí primerů při amplifikaci DNA. K identifikaci hub slouží oblast ITS2 v rDNA (Obr. 11).



Obrázek 11: Pozice ITS1, ITS4 a gITS7 v houbové rDNA. Podjednotky využívané k identifikaci hub jsou oddělené mezníkem (převzato z <http://gatc-biotech.com>).

Pomocí NGS sekvenování, tzv. nové generace („New Generation Sequencing“) jsme provedli analýzu sekvencí. Hlavní rozdíl od klasické Sangerovské metody spočívá v možnosti sekvenovat velké množství ampliconů v jednom strojovém běhu zároveň. Výhodou je i přesnější syntéza (díky reverzibilním terminátorům zabudovaným do dNTPs, které zabraňují inkorporaci více nukleotidů v jednom cyklu) a celkové nižší finanční náklady.

4.5.1 PCR amplifikace oblasti ITS2

Pro pomnožení byly použity primery gITS7 (5'-GTGAATCATCGAATCTTTG-3'; Ihmark *et al.*, 2012) a ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; White *et al.*, 1990). Jeden z primerů pro ITS4 oblast obsahoval 10 bází dlouhý nukleotidový přesah. Tyto sekvence byly pro každý vzorek specifické a sloužily k rozlišení vzorků po sekvenaci na platformě Illumina MiSeq.

Složení reakční směsi pro amplifikace DNA pomocí PCR, která probíhala v triplikátech:

- 2,5 µl 10x ředěného pufru pro DyNAzym II DNA Polymeráza
- 1,5 µl BSA 10 mg/ml
- 0,5 µl PRC Nucleotide Mix (10mM)
- 1 µl primer gITS7 (10 pmol/µl)
- 1 µl primer ITS4 s identifikační sekvencí (10 pmol/µl)
- 0,75 µl 4% Pfu polymerázy v DyNAzyme II DNA Polymeráza
- 1 µl templátová DNA (koncentrace do 100 ng/µl)
- Doplněné do 25 µl H₂O

Amplifikační program PCR:

- 94 °C, 5min
- 35x (94 °C 30s denaturace, 56 °C 30s nasazení primerů, 72 °C 30s elongace)
- 72 °C 7min
- 4 °C hold

Úspěšnost amplifikace byla ověřována pomocí gelové elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu (agaróza + roztok TAE pufr) s 4 µl EtBr (ethidium bromid). Jako velikostní marker byl použit O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. 3µl z každého vzorku byly smíchány s DNA Loading Dye. Separace fragmentů DNA probíhala 25 – 30 min při 90 V a 500 W a k jejich vizualizaci byl použit UV transiluminátor.

4.5.2 Příprava DNA knihovny a sekvenace

Triplikáty PCR produktů byly sloučeny a zakoncentrovány kitem Min Elute Purification Kit (Qiagen, USA). Jejich koncentrace byla změřena na fluorometru Qubit (Invitrogen, Rakousko). Poté byly připraveny knihovny DNA. Jedna knihovna obsahovala 48 vzorků o koncentraci 1000 ng celkové DNA. Vzorky byly smíchány v ekvimolárním poměru.

Před vlastní sekvenací na platformě Illumina, kdy dochází nejprve k tzv. můstkové amplifikaci a poté k vlastní sekvenaci (tzv. sekvenace syntézou), bylo potřeba zajistit přítomnost adaptorů na koncích molekuly DNA. K ligaci adaptorů byl použit kit TruSeq® DNA PCR-Free LT Kit (Illumina, USA).

V prvním kroku dochází k zatupení konců DNA za pomoci enzymového mixu s 3' → 5' exonukleázovou a 5' → 3' polymerázovou aktivitou. Pomocí kitu Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA) byly odstraněny krátké fragmenty DNA. Dalším krokem byla na 5'-konec připojena fosfátová skupina a na 3' konec adeninový přesah. V posledním kroku došlo k naligování adaptoru na 3' konec. Adaptor obsahoval tři T, kompatibilní k A přesahu. Pomocí kvantitativní PCR (qPCR) bylo ověřeno úspěšné naligování adaptorů. Byl použit komerčně dostupný kit KAPA Library Quantification Kit for Illumina sequencing platforms (Illumina, USA). Takto jsme připravili tzv. sekvenační knihovny, které byly sekvenovány v přístroji MiSeq Illumina.

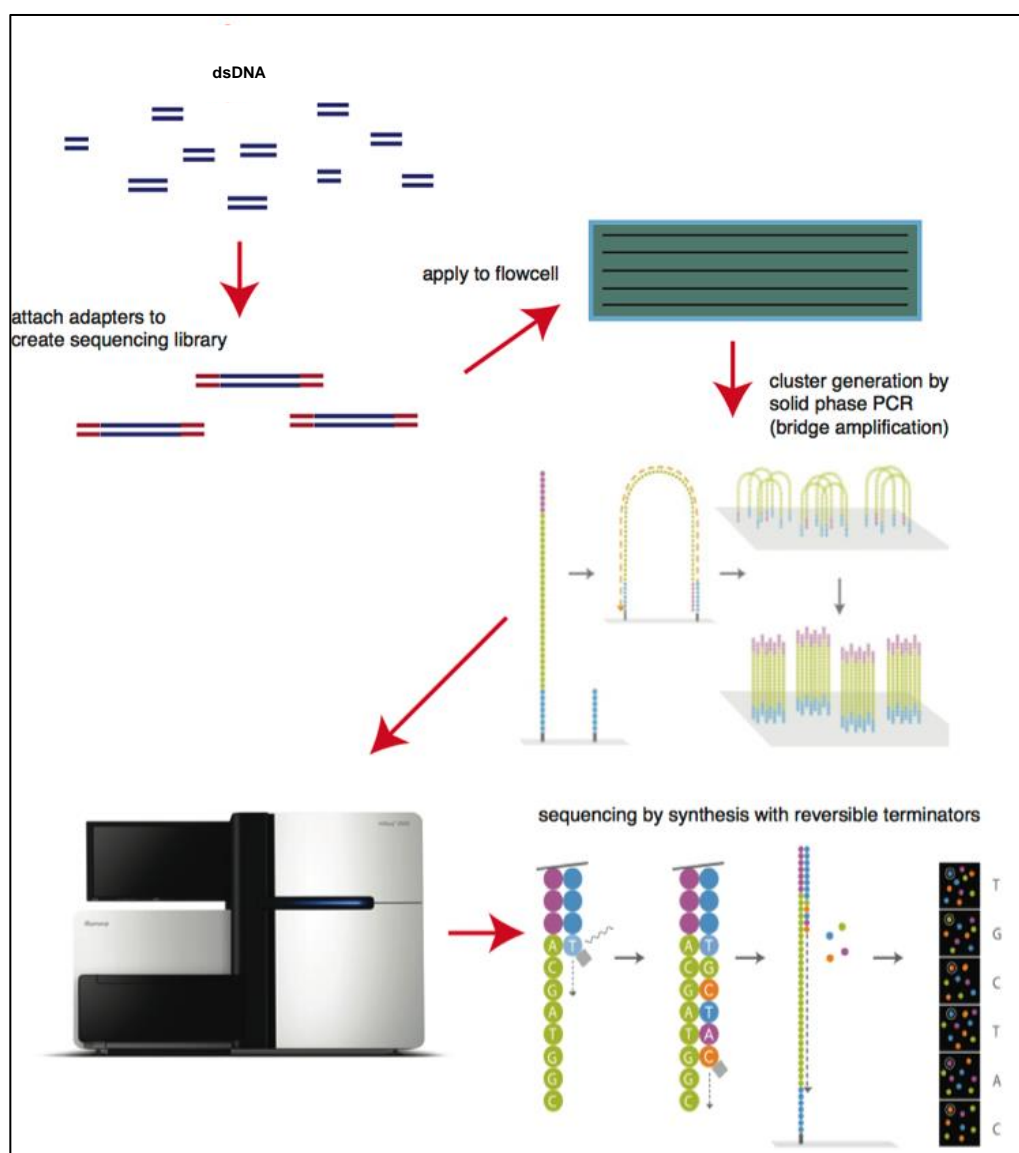
Denaturované knihovny, tedy úseky ssDNA (jednořetězcová DNA – „single strand DNA“) jsou v přístroji imobilizovány na destičce (tzv. „flow cell“): na povrchu této sekvenační destičky se nacházejí krátké řetězce oligonukleotidů, které jsou komplementární k sekvenci naligovaných adaptorů. Po hybridizaci druhého, volného, konce molekuly ssDNA s adaptorem vzniká můstek („bridge“). Následuje tzv. můstková amplifikace („bridge PCR“), kdy dochází k dosyntetizování druhého vlákna. Krátké oligonukleotidy slouží jako primery. Můstková amplifikace se na destičce několikrát opakuje a tak se utvářejí klastry obsahující až 1000 kopií původní molekuly ssDNA. Těchto klastrů může být na destičce přítomno až milión. Poté dochází k vlastní sekvenaci – dosyntetizování druhého vlákna DNA za využití fluorescenčně značených nukleotidů s navázaným reverzibilním terminátorem. V každém cyklu se inkorporuje vždy jeden značený nukleotid, pomocí laseru a kamery je detekována jeho fluorescence (každý nukleotid má jiný fluorofor; každý klastr inkorporuje stejný nukleotid a tím je signál z klastru amplifikován). Po detekci signálu je syntézu blokující terminátor enzymaticky odštěpen a může dojít k dalšímu cyklu (inkorporaci alšího nukleotidu; Quail *et al.*, 2012). Schéma sekvenace viz Obr. 12.

Vlastní sekvenování proběhlo v externí laboratoři (společnost GeneTiCA s.r.o., Olomouc).

4.5.3 Bioinformatické zpracování sekvencí – sekvenace MiSeq

Z překrývajících se konců stejného fragmentu DNA byla za pomoci technologie paired-end sequencing sestavena výsledná sekvence. Byla vyextrahována oblast ITS2 a párové sekvence byly přes vzájemný překryv spojeny do jedné. Sekvence byly analyzovány v programu SEED v souladu s doporučenou metodikou (Větrovský a Baldrian, 2013). Konce byly spárovány a chimerické sekvence odstraněny programem UCHIME (Edgar, 2010).

Na základě 97% podobnosti byly sekvence programem UPARSE sdruženy do klastrů (Edgar 2010). Globální alignment (uspořádání) sekvencí proběhl v programu MAFFT64 (Kato *et al.*, 2009). V dalším kroku se pro každý klastř vytvořila konsenzuální sekvence, které byly seskupeny do konečných klastrů. Jednalo se o úroveň vzájemné podobnosti sekvencí na úrovni druhu a byly tak získány tzv. molekulární druhy – operační taxonomické jednotky (OTU). Tyto operační taxonomické jednotky byly následně identifikovány použitím algoritmu BLASTn proti nukleotidové databázi UNITE (Koljalg *et al.*, 2005) a GenBank (Benson *et al.*, 2009).



Obrázek 12: Schéma sekvence na platformě Illumina MiSeq. Po přípravě sekvenační knihovny dochází k můstkové amplifikaci fragmentů DNA. Poté, při vlastní sekvenaci, dochází vždy v jednom cyklu k inkorporaci fluorescenčně značeného nukleotidu, jeho detekci a následnému odstranění reverzibilního terminátoru. Poté probíhá další cyklus.

4.6 První experiment: Stanovení enzymatické aktivity

Ke 250 mg lyofilizovaného vzorku bylo přidáno 12 ml acetátového pufru a vzorek byl extrahován po dobu 2 hodin při 4 °C na orbitální třepače. Po přefiltrování extraktů byla možná jejich analýza. Byla stanovena aktivita pro endocelulázy, endoxylulázy a lakázy (viz kapitola 4.4.4. Stanovení enzymatické aktivity u vybraných extracelulárních degradačních enzymů). Dále byla stanovena aktivita MnP a vybrané hydrolázy.

Enzym MnP katalyzuje oxidativní kondenzaci látek MBTH a DMAB. Reakce probíhá v sukcinát-laktátovém pufru (100mM, pH 4,5). Vzniklé zbarvení je detekováno spektrofotometricky při 595 nm (Ngo a Lenhoff 1980). Dle aktivity vzorku s ekvimolárním množstvím EDTA, který nahrazoval ionty $MnSO_4$, byly výsledky dále upravovány.

Z hydrolytických enzymů byla stanovena aktivita β -glukosidázy, celobiohydrolázy, β -xylosidázy, N-acetylglukosaminidázy (chitinázy), β -glukuronidázy, fosfatázy, lipázy a α -glukosidázy. Měření probíhalo za pomoci fluorescenčně značených substrátů (Tab. 5). Umístění vzorků, substrátů a kalibračních roztoků do mikrotitrační destičky podle Tab. 6 (Postup viz kapitola 4.4.4. Stanovení enzymatické aktivity u vybraných extracelulárních degradačních enzymů).

Tabulka 5: Substráty značené fluorescenční molekulou – methylumbellyferol (MUF) pro jednotlivé enzymy.

Stanovovaný enzym	Substrát
β -glukosidáza	2,75 mM 4-methylumbellyferyl- β -D-glukopyranosid (MUFG)
celobiohydroláza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranosid (MUFC)
β -xylosidáza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl- β -D-xylopyranosid (MUFX)
chitináza	1,00 mM 4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid (MUFN)
β -glukuronidáza	2,50 mM bis-4-methylumbellyferyl-glukuronid (MUFU)
fosfatáza	2,75 mM 4-methylumbellyferyl-fosfát (MUFP)
lipáza	2.50 mM 4-methylumbellyferyl-caprylát (MUFY)
α -glukosidáza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl α -D-glucopyranoside (MUFaG)

Tabulka 6: Mikrotitrační destička s umístěním substrátů a kalibračních roztoků, které byly připraveny ředěním 1mM roztoku MUF.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 MUGG	1 MUGG	1 MUGG	2 MUGG	2 MUGG	2 MUGG	3 MUGG	3 MUGG	3 MUGG	1	2	3
B	1 MUGC	1 MUGC	1 MUGC	2 MUGC	2 MUGC	2 MUGC	3 MUGC	3 MUGC	3 MUGC	1+10µl MUF 1/100	2+10µl MUF 1/100	3+10µl MUF 1/100
C	1 MUGX	1 MUGX	1 MUGX	2 MUGX	2 MUGX	2 MUGX	3 MUGX	3 MUGX	3 MUGX	1+20 µl MUF 1/100	2+20 µl MUF 1/100	3+20 µl MUF 1/100
D	1 MUGN	1 MUGN	1 MUGN	2 MUGN	2 MUGN	2 MUGN	3 MUGN	3 MUGN	3 MUGN	1+50 µl MUF 1/100	2+50 µl MUF 1/100	3+50 µl MUF 1/100
E	1 MUGU	1 MUGU	1 MUGU	2 MUGU	2 MUGU	2 MUGU	3 MUGU	3 MUGU	3 MUGU	1+20 µl MUF 1/10	2+20 µl MUF 1/10	3+20 µl MUF 1/10
F	1 MUGP	1 MUGP	1 MUGP	2 MUGP	2 MUGP	2 MUGP	3 MUGP	3 MUGP	3 MUGP	1+50 µl MUF 1/10	2+50 µl MUF 1/10	3+50 µl MUF 1/10
G	1 MUGY	1 MUGY	1 MUGY	2 MUGY	2 MUGY	2 MUGY	3 MUGY	3 MUGY	3 MUGY	1+10 µl MUF	2+10 µl MUF	3+10 µl MUF
H	1 MUGaG	1 MUGaG	1 MUGaG	2 MUGaG	2 MUGaG	2 MUGaG	3 MUGaG	3 MUGaG	3 MUGaG	1+20 µl MUF	2+20 µl MUF	3+20 µl MUF

4.7 První experiment: Stanovení houbové biomasy

Ergosterol představuje specifický lipid, který se vyskytuje v plazmatické membráně buněk nižších eukaryot a to zejména v buňkách hub a kvasinek. Stanovení tohoto lipidu je využíváno k určení celkové biomasy hub. Pro stanovení ergosterolu se postupovalo podle metody v práci Šnajdr *et al.*, 2008. Bylo odváženo 0,5 g lyofilizovaného vzorku a sonikováno 3 ml 10% KOH v metanolu při teplotě 70 °C po dobu 90 min. Dále se přidal 1 ml dH₂O a provedla se extrakce vzorků (3x) v 2 ml cyklohexanu. Pomocí dusíku byl cyklohexan ze supernatantu odpařen a vzorek byl rozpuštěn v 1 ml metanolu. Dále proběhla analýza na kapalinovém chromatografu Waters Alliance HPLC systém (Waters, USA) a spektrofotometrické měření při 282 nm. Rychlost průtoku mobilní fáze metanolu byla 1 ml x min⁻¹. Toto stanovení prováděl laborant.

4.8 První experiment: Stanovení rychlosti dekompozice kořenů, elementární analýza a stanovení pH

Pro stanovení rychlosti dekompozice byly získané vzorky nejdříve zváženy, poté zamrazeny při -80°C a lyofilizovány. Po vakuovém vymrazení byly znovu převáženy. Rychlost rozkladu byla stanovena na základě porovnání s počáteční hmotností a vlhkost vzorků byla stanovena jako podíl hmotnosti vzorku před a po lyofilizaci.

Prvkové složení (obsah C a N) u vybraných lyofilizovaných kořenů bylo změřeno v externí laboratoři (Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, v. v. i.). Pro stanovení pH byly vzorky smíseny s H_2O (1:10 w/v).

4.9 Druhý experiment: Izolace a charakterizace hub z kořenů smrku

4.9.1 Kultivace a izolace hub

Kořeny pro izolaci hub byly nastříhány a povrchově sterilizovány ponořením po dobu 30 s do 10 – 20% roztoku chlornanu sodného (Unilever ČR, spol. s r.o.). Následně byly propláchnuty ve sterilní kkH_2O a vysety na Petriho misku se selektivním kultivačním médiem MERBS. Kultura byla uložena v temnu při 25°C do té doby než porostla celý povrch. Následně byla umístěna do lednice při teplotě 4°C . Přeočkování čistých kultur na nové medium MERBS probíhalo přibližně každé 2 měsíce.

4.9.2 Izolace DNA z izolátů

Část kultury byla přenesena do 1,5ml mikrozumavky a genomová DNA byla izolována kitem ArchivePure DNA Yeast and Gram-positive Bacteria kit (5PRIME, Rakousko). Po přidání lyzačního pufru byly vzorky homogenizovány 1 min na FastPrep (MP Biomedicals, US). Dále se postupovalo dle protokolu výrobce.

4.9.3 PCR amplifikace oblasti ITS1F

Vyizolovaná DNA z narostlých kultur sloužila jako předloha v PCR reakci, za použití primerů ITS-1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') a NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') pro ITS a 28S rDNA oblasti (Gardes a Bruns, 1993).

Složení reakční směsi pro amplifikace DNA pomocí PCR:

- 2,5 µl 10x ředěného pufru pro DyNAzym II DNA Polymeráza
- 1,5 µl BSA 10 mg/ml
- 0,5 µl PCR Nucleotide Mix (10mM)
- 1 µl primer gITS1f
- 1 µl primer NL4
- 0,75 µl 4% Pfu polymerázy v DyNAzyme II DNA Polymeráza
- 1 µl templátová DNA (koncentrace do 100 ng/µl)
- Doplněné do 25 µl H₂O

Amplifikační program PCR:

- 94 °C, 5min
- 35x (94 °C 30s denaturace, 56 °C 30s nasazení primerů, 72 °C 30s elongance)
- 72 °C 7min
- 4 °C hold

Úspěšnost amplifikace byla ověřována pomocí gelové elektroforézy (viz kapitola 4.5.1. PCR amplifikace oblasti ITS2)

Extrahovaná DNA jednotlivých vzorků bylo po 20 µl napipetována do 96 jamkové destičky a následně odeslána na sekvenaci do externí laboratoře GATC Biotech (Konstanz, SRN).

4.9.4 Stanovení enzymatické aktivity u vybraných extracelulárních degradačních enzymů

Vybrané izoláty hub byly přeočkovány na kultivační medium ME a inkubovány při 23 °C. Po 1 – 2 týdnech byly přeočkovány do 250ml Erlenmeyerových baněk obsahujících 40 ml tekutého ME media a 0,1 g celulózy (tři baňky / izolát) a kultivovány stacionárně při 23 °C. Následně bylo tekuté medium obsahující enzymy přefiltrováno přes filtrační papír a analyzováno. Aktivita enzymů byla stanovena pro α -glukozidázy, β -glukozidázy, fosfomonoesterázy (fosfatázy), fosfodiesterázy, arylsulfatázy, N-acetyl-glukozamidázy (chitinázy), celobiohydrolázy (exocelulázy) a β -xylozidázy. Dále byla změřena aktivita enzymů, endocelulázy, endoxylanázy a lakázy.

Hydrolytické enzymy byly stanoveny dle metodiky popsané v Baldrian (2009). Aktivita enzymů byla stanovena spektrofotometricky za použití fluorescenčně značených substrátů. (Tab. 3). Do mikrotitrační destičky bylo k substrátům pro stanovení fosfatázy a β -glukozidázy přidáno 20 μ l DMSO pro lepší rozpustnost (A 1-6, G 1-6). Dále bylo do příslušných jamek (1-6, A-H) napipetováno 40 μ l značeného substrátu o koncentraci 500 μ M. Kalibrační řada byla připravena dle tabulky 4. Do všech jamek bylo přidáno 100 μ l 50mM octanového pufru (pH 5,0) a 100 μ l vzorku. Destička byla inkubována v termostatu při 40 °C.

Odečet fluorescence proběhl po 5, 35 a 125 minutách na spektrofotometru (Infinite 200, TECAN, Rakousko) při excitační vlnové délce 355 nm a emisní vlnové délce 460 nm.

Tabulka 3: Substráty značené fluorescenční molekulou – methylumbellyferol (MUF) pro jednotlivé enzymy.

Stanovovaný enzym	Substrát
β -glukosidáza	2,75 mM 4-methylumbellyferyl- β -D-glukopyranosid (MUFG)
α -glukosidáza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl α -D-glucopyranoside (MUFaG)
celobiohydroláza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranosid (MUFC)
β -xylosidáza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl- β -D-xylopyranosid (MUFX)
chitináza	1,00 mM 4-methylumbellyferyl-N-acetylglukosaminid (MUFN)
arylsulfatáza	2,50 mM 4-methylumbellyferyl síran draselný (MUFS)
fosfatáza	2,75 mM 4-methylumbellyferyl-fosfát (MUFP)
fosfodiesteráza	2,50mM bis-methylumbellyferyl-fosfát (MUFPP)

Tabulka 4: Mikrotitrační destička s umístěním substrátů a kalibračních roztoků, připravené ředěním 1mM roztoku MUF

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 MUGG	1 MUGG	1 MUGG	2 MUGG	2 MUGG	2 MUGG	1	1	1	2	2	2
B	1 MUF αG	1 MUF αG	1 MUF αG	2 MUF αG	2 MUF αG	2 MUF αG	1+10μl MUF 1/100	1+10μl MUF 1/100	1+10μl MUF 1/100	2+10μl MUF 1/100	2+10μl MUF 1/100	2+10μl MUF 1/100
C	1 MUF C	1 MUF C	1 MUF C	2 MUF C	2 MUF C	2 MUF C	1+20μl MUF 1/100	1+20μl MUF 1/100	1+20μl MUF 1/100	2+20μl MUF 1/100	2+20μl MUF 1/100	2+20μl MUF 1/100
D	1 MUF X	1 MUF X	1 MUF X	2 MUF X	2 MUF X	2 MUF X	1+50μl MUF 1/100	1+50μl MUF 1/100	1+50μl MUF 1/100	2+50μl MUF 1/100	2+50μl MUF 1/100	2+50μl MUF 1/100
E	1 MUF N	1 MUF N	1 MUF N	2 MUF N	2 MUF N	2 MUF N	1+20μl MUF 1/10	1+20μl MUF 1/10	1+20μl MUF 1/10	2+20μl MUF 1/10	2+20μl MUF 1/10	2+20μl MUF 1/10
F	1 MUF S	1 MUF S	1 MUF S	2 MUF S	2 MUF S	2 MUF S	1+50μl MUF 1/10	1+50μl MUF 1/10	1+50μl MUF 1/10	2+50μl MUF 1/10	2+50μl MUF 1/10	2+50μl MUF 1/10
G	1 MUF P	1 MUF P	1 MUF P	2 MUF P	2 MUF P	2 MUF P	1+20μl MUF	1+20μl MUF	1+20μl MUF	2+20μl MUF	2+20μl MUF	2+20μl MUF
H	1 MUF PP	1 MUF PP	1 MUF PP	2 MUF PP	2 MUF PP	2 MUF PP	1+50μl MUF	1+50μl MUF	1+50μl MUF	2+50μl MUF	2+50μl MUF	2+50μl MUF

Aktivita endocelulázy a endoxylánázy byla měřena za pomoci substrátů karboxymethylcelulózy a xylanu s nekovalentně vázaným azo-barvivem (Megazyme, Irsko) podle protokolu výrobce. Do 1,5ml mikrozkrumavek bylo napipetováno 150 μl vzorku a 150 μl substrátu. Inkubace, která probíhala při 40 °C po dobu 10 min až 2 hodin. Ukončena byla přidáním 750 μl etanolu a následným vortexováním (10 s) a centrifugací (10 000 x g, 10 min). Následovalo spektrofotometrické měření, pro zjištění množství uvolněného barviva. Absorbce byla změřena při 595 nm (Baldrian, 2009a). Enzymová aktivita byla stanovena na základě srovnání dat s kalibračními křivkami.

Pro stanovení enzymatické aktivity lakázy byla monitorována oxidace substrátu ABTS v citrát-fosfátovém pufru. Do jamky bylo napipetováno 50 μl vzorku, ke kterému bylo přidáno 50 μl ABTS a 150 μl citrát-fosfátového pufru (100 mM citrát, 200 mM fosfát) pH 5. Měření probíhalo po dobu 3 min každých 30 sekund (7x30 s) a po dobu 12 minut každé 2 minuty (7x2 min) ve spektrofotometru (Infinite 200, TECAN, Rakousko) při vlnové délce 420 nm a 40 °C.

4.10 Statistické metody

Data pro statistické analýzy představovaly změřenou aktivitu enzymů a jejich porovnání v čase a prostoru. Statisticky významné rozdíly v naměřených aktivitách byly testovány pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) a následované Fisherův LSD *post hoc* testem. Rozdíly na hladině $p < 0,05$ byly vyhodnoceny jako statisticky významné, signifikantní.

4.11 Složení roztoků a médií pro izolaci hub

Acetátový pufr, 50 mM, pH = 5

- 1000 ml destilovaná H₂O
- 900 μl octová kyselina
- 2,78 g octan sodný

100 mM citrát – 200 mM fosfátový pufr, pH = 5

- 100 ml destilované H₂O
- 3,56 g Na₂HPO₄ 2H₂O
- 2,1 g monohydrát kyseliny citrónové

Roztok NaOH, 5 M

- 199,99 g NaOH
- 1 l destilované H₂O

Sukcinát-laktátový pufr, 100 mM pH = 4,5

- 100 ml dH₂O
- 1,64 g DL-mléčná kyselina NaCl 60%
- 0,146 g sukcinová kyselina

MERBS + ATB

- 20g/l Malt Extract
- 0,05g/l Rose Bengal
- 15 g/l Agar
- 2 ml/l Streptomycin

ME

- 20 g/l Malt Extract
- 15 g/l Agar

5 Výsledky

Cílem prvního experimentu bylo popsat složení mikrobiálního společenstva hub v **K** (kořenech), **R** (rhizosféře) a **B** („bulk soil“ – okolní půda) u živých stromů a popsat případné změny tohoto složení po ukončení toku asimilátů v důsledku pokácení stromů.

Houbová DNA byla izolována a identifikována sekvenací ITS2 mezerníku DNA. Následně byla zjištěna abundance ECM a saprotrofních zástupců ve všech třech zkoumaných kompartmentech. Pomocí enzymatické aktivity byla popsána degradační schopnost rostlinné biomasy a její změna v čase a prostoru. Celková biomasa hub byla stanovena pomocí ergosterolu obsaženého ve vzorcích.

Druhý experiment byl zahájen 5 měsíců po ukončení toku asimilátů. Z odebrané půdy byly kořeny separovány, jemně omyty, sterilizovány a vysety na kultivační medium. Z narostlých kultur byla izolována houbová DNA a na základě sekvenace identifikována. U vybraných OTUs byla stanovena enzymatická aktivita.

5.1 Charakteristika společenstva hub za přísunu asimilátů a po ukončení toku asimilátů z kořenů do půdního prostředí *Picea abies* a postupný vývoj mikrobiálního složení hub v kořenech, rhizosféře a půdě v čase a prostoru

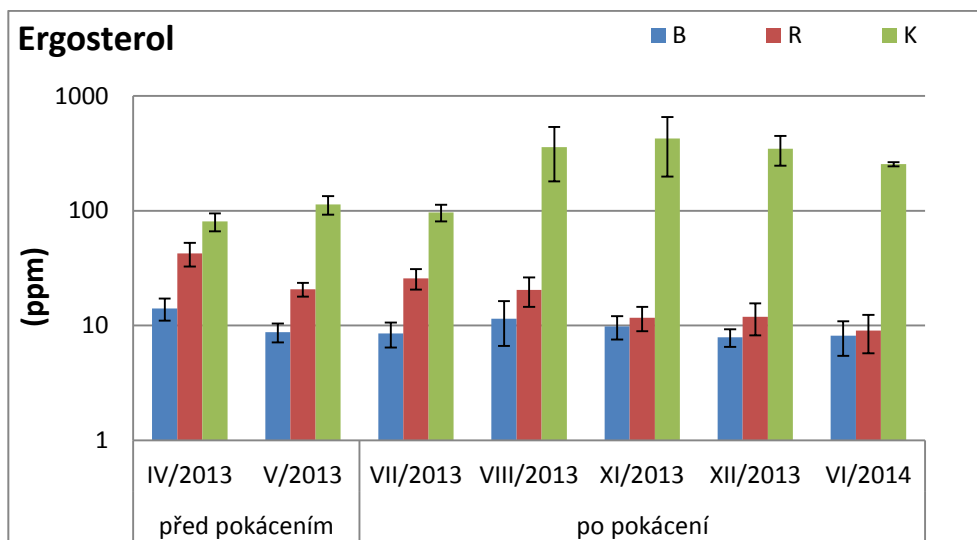
5.1.1 Obsah biomasy hub

Před pokácením stromů bylo nejvyšší zastoupení houbové biomasy v kořenech. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny jako signifikantní v porovnání se zastoupením houbové biomasy v rhizosféře a okolní půdě.

Pro první odběr IV/2013 za přísunu asimilátů se obsah ergosterolu významně lišil mezi rhizosférou a půdou, kdy v R bylo zastoupení houbové biomasy signifikantně vyšší.

Po ukončení toku asimilátů docházelo k postupnému poklesu houbové biomasy v R a B. Naměřené hodnoty houbové biomasy v R a B se v posledním odběru VI/2014 významně nelišily.

Množství biomasy hub v B bylo stabilní a významné změny zaznamenány nebyly. Naopak v K byl zaznamenán signifikantní nárůst houbové biomasy, $P < 0,05$ (ANOVA, Fisherův *post hoc* LSD test; Obr. 13).



Obrázek 13: Obsah biomasy hub v kořenech, rhizosféře a půdě.

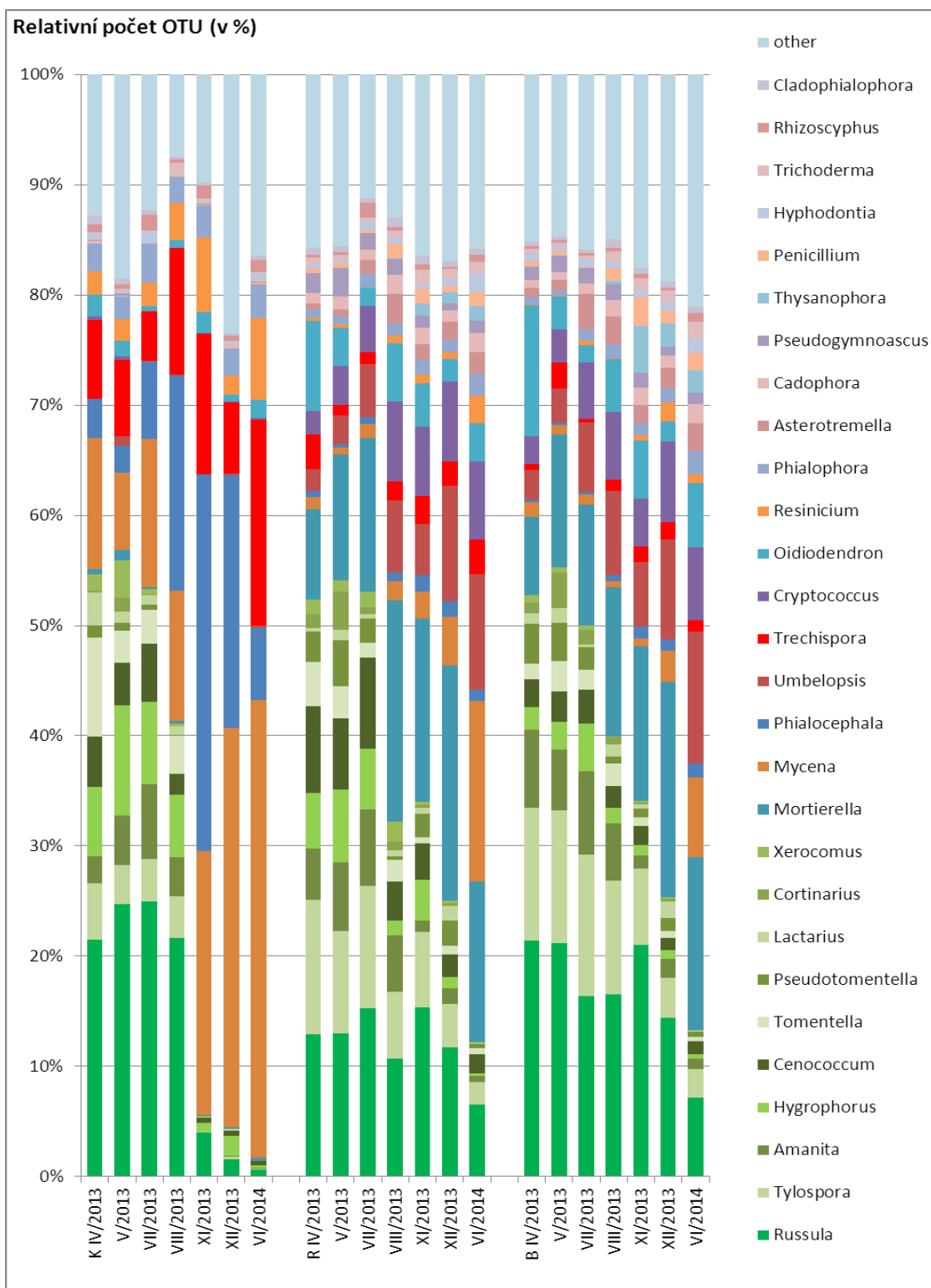
5.1.2 Složení společenstva hub za přísunu asimilátů a po ukončení toku asimilátů z kořenů do půdního prostředí *Picea abies* - v kořenech, rhizosféře a půdě

Určení zástupců hub, jejich zařazení do oddělení a rodů proběhlo pomocí sekvenace ITS2 mezerníku DNA. Celkem bylo získáno 1 981 643 sekvencí dostatečné délky a kvality. Po zarovnání a uspořádání sekvencí na základě 97% podobnosti byly tyto sekvence zařazeny do 14 607 OTU (operational taxonomic unit). Pro tyto byly nalezeny nejbližší identifikovatelné sekvence pomocí programu BLASTn. U 1 421 OTU se v databázi nenašla žádná identifikace, případně se jednalo o organismy nehoubového původu, tyto sekvence nebyly hodnoceny. Dále se pracovalo s 1 842 543 houbových sekvencí. Bylo identifikováno 113 řádů a 893 rodů hub. K dalšímu zpracování a vyhodnocení byly vybrány rody s nejvyšší abundancí (Tab. 7). Počty jejich sekvencí byly normalizovány na 1000 a ‰.

Tabulka 7: Abundance detekovaných rodů. Počty sekvencí byly normalizovány na 1000, dále bylo vypočteno % zastoupení. Tabulka zahrnuje top 2 vybraných se zcela převládající dominancí ECM.

oddělení	řád	ekologie	rod	abundance [%]
Basidiomycota	<i>Russulales</i>	ECM	Russula	16,56
Basidiomycota	<i>Atheliales</i>	ECM	Tylospora	7,03
Basidiomycota	<i>Agaricales</i>	ECM	Amanita	3,75
Basidiomycota	<i>Agaricales</i>	ECM	Hygrophorus	3,68
Ascomycota	<i>Dothideomycetes other</i>	ECM	Cenococcum	3,54
Basidiomycota	<i>Thelephorales</i>	ECM	Tomentella	2,18
Basidiomycota	<i>Thelephorales</i>	ECM	Pseudotomentella	1,60
Basidiomycota	<i>Russulales</i>	ECM	Lactarius	0,86
Basidiomycota	<i>Agaricales</i>	ECM	Cortinarius	0,75
Basidiomycota	<i>Boletales</i>	ECM	Xerocomus	0,71
Mortierellomycotina	<i>Mortierellales</i>	Saprotrof	Mortierella	11,78
Basidiomycota	<i>Agaricales</i>	Saprotrof	Mycena	10,47
Ascomycota	<i>Helotiales</i>	Saprotrof	Phialocephala	6,08
Mucoromycotina	<i>Mucorales</i>	Saprotrof	Umbelopsis	5,41
Basidiomycota	<i>Trechisporales</i>	Saprotrof	Trechispora	4,94
Basidiomycota	<i>Tremellomycetes other</i>	Saprotrof	Cryptococcus	4,33
Ascomycota	<i>Leotiomyces other</i>	Saprotrof	Oidiodendron	4,15
Basidiomycota	<i>Hymenochaetales</i>	Saprotrof	Resinicium	2,19
Ascomycota	<i>Chaetothyriales</i>	Saprotrof	Phialophora	2,00
Basidiomycota	<i>Tremellales</i>	Saprotrof	Asterotremella	1,42
Ascomycota	<i>Helotiales</i>	Saprotrof	Cadophora	1,10
Ascomycota	<i>Leotiomyces other</i>	Saprotrof	Pseudogymnoascus	1,08
Ascomycota	<i>Eurotiales</i>	Saprotrof	Thysanophora	0,88
Ascomycota	<i>Eurotiales</i>	Saprotrof	Penicillium	0,81
Basidiomycota	<i>Corticiales</i>	Saprotrof	Hyphodontia	0,71
Ascomycota	<i>Hypocreales</i>	Saprotrof	Trichoderma	0,71
Ascomycota	<i>Helotiales</i>	Saprotrof	Rhizoscyphus	0,65
Ascomycota	<i>Chaetothyriales</i>	Saprotrof	Cladophialophora	0,61

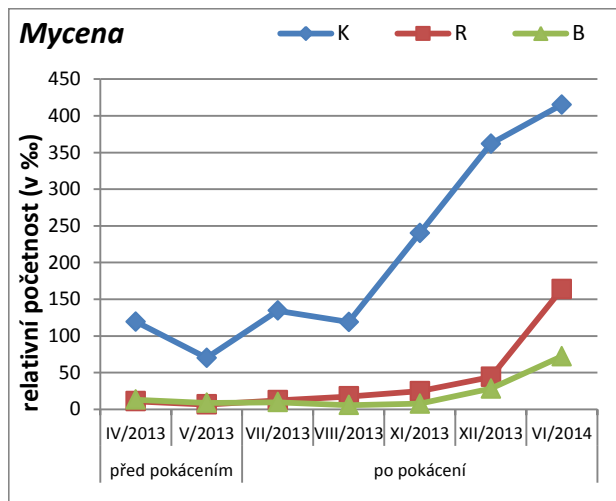
Grafické znázornění dominantních zástupců ECM a saprotrofních hub v K, R a B (Obr. 14).



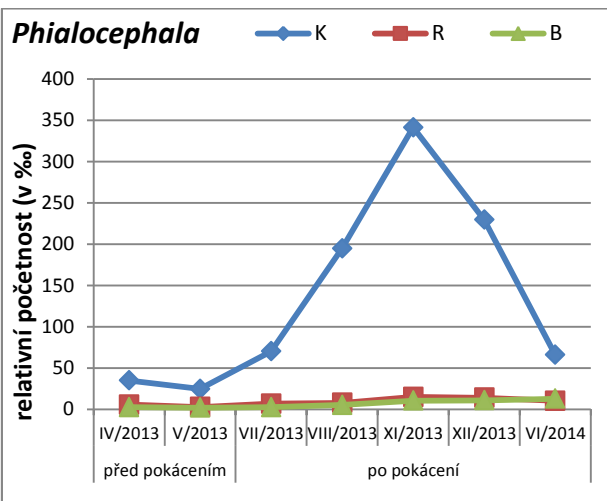
Obrázek 14: Zastoupení OTU v K (kořen), R (rhizosféra) a B (bulk soil – okolné půda) a změna jejich biologické rozmanitosti ukončení toku asimilátů - po pokácení stromů. Rozdělení dle životní strategie ECM (spektrum zelené) a saprotrofové (ostatní spektrum barev).

Z ECM zástupců byla převaha rodů *Russula* a *Tylospora*. U saprotrofních zástupců převládaly rody *Mortierella*, *Mycena*, *Phialocephala*, *Umbelopsis* a *Trechiospora*.

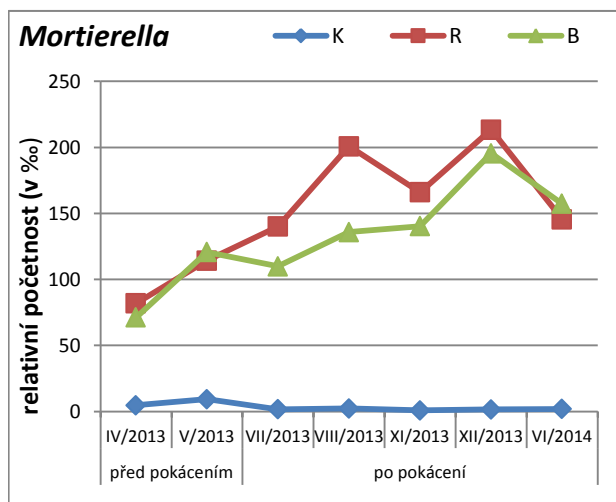
U saprotrofních zástupců byla zaznamenána preference určitého typu vzorků (Obr. 15 – 18), pro ECM zástupce takovéto preference zaznamenány nebyly. V K byla diverzita hub v porovnání s R a B spíše nižší, jak za přísunu asimilátů, tak i po ukončení jejich toku. Po ukončení toku asimilátů došlo ke snížení diverzity hub v K, naopak v R a B byl zaznamenán její nárůst (Obr. 19).



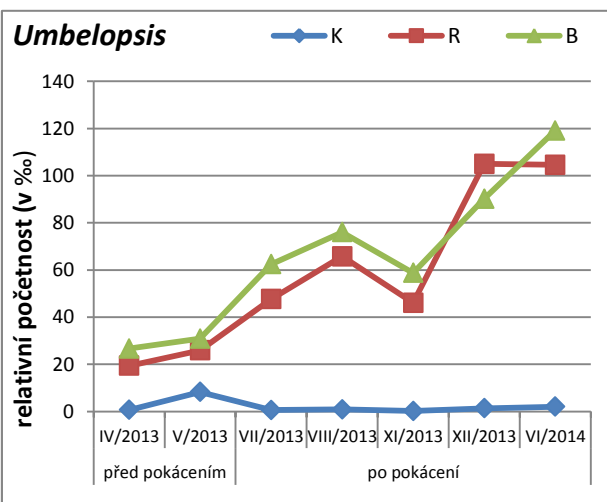
Obrázek 15: Preference zástupců *Mycena* (saprotrof, Basidiomycota) pro kořen. (K- kořen, R- rhizosféra, B – okolní půda).



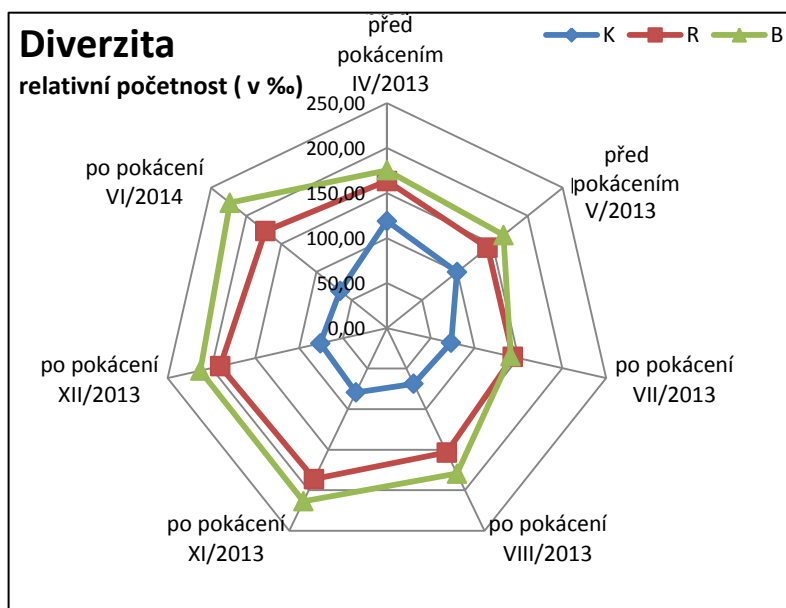
Obrázek 16: Preference zástupců *Phialocephala* (saprotrof Ascomycota) pro kořen. (K- kořen, R- rhizosféra, B – okolní půda).



Obrázek 17: Preference zástupců *Mortierella* (saprotrof, Mortierellomycotina) pro rhizosféru a okolní půdu. (K- kořen, R- rhizosféra, B – okolní půda).

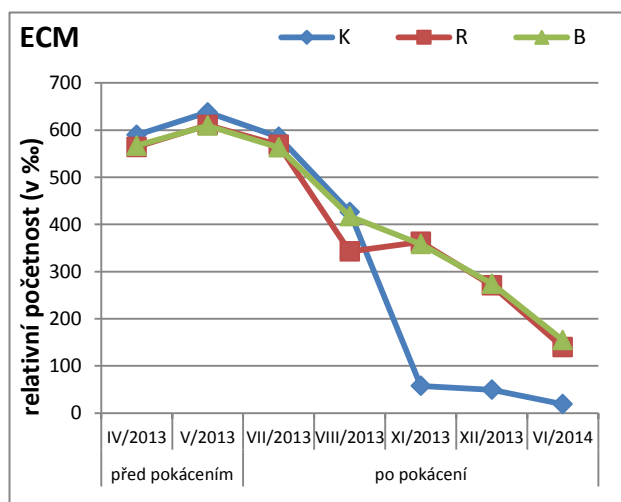


Obrázek 18: Preference zástupců pro *Umbelopsis* (saprotrof, Mucoromycotina) pro rhizosféru a okolní půdu. (K- kořen, R- rhizosféra, B – okolní půda).

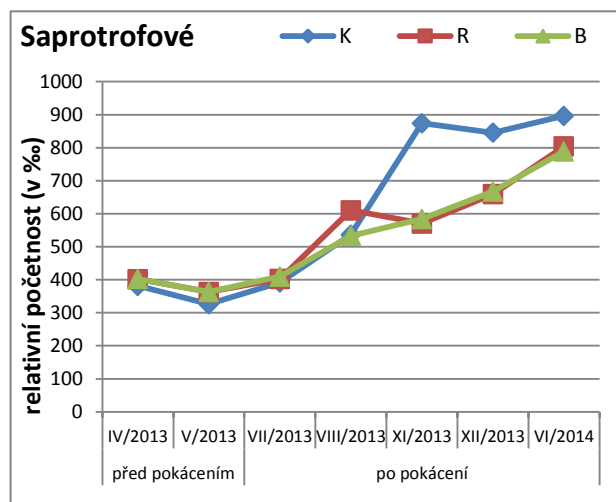


Obrázek 19: Diverzita hub v K, R a B. Průměrná četnost OTU (K – kořen, R – rhizosféra, B – okolní půda)

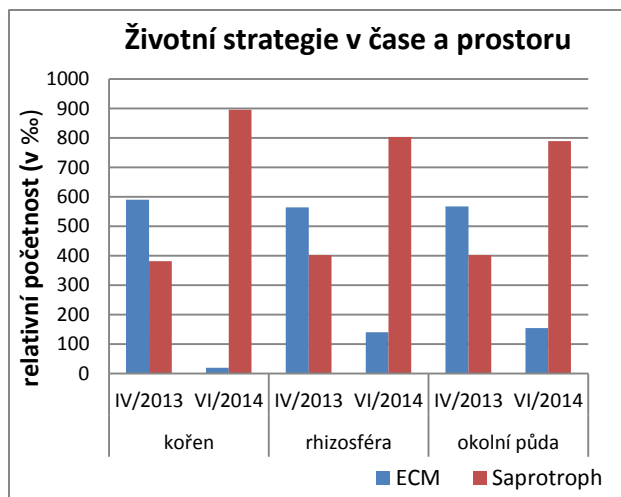
U prvního odběru IV/2013 (za přísunu asimilátů) převládaly ve všech třech kompartmentech ECM (ektomykorhizní) zástupci hub. Na obr. 20, za přísunu asimilátu, představují ECM houby 60 % (odběr IV/2013: K- 61 %, R- 58 %, B- 59 %). Z toho 40 % saprotrofních zástupců (odběr IV/2013: K- 39 %, R- 42 %, B- 41 %). Po ukončení toku asimilátů dochází k postupnému úbytku ECM (odběr VI/2014: K- 2 %, R- 15 %, B- 16 %). Pro saprotrofní zástupce byl pozorován opačný trend (odběr VI/2014: K- 98 %, R- 85 %, B- 84 %; Obr. 21). Rozdíly v početnosti sekvencí saprotrofních a ECM zástupců mezi prvním a posledním provedeným odběrem byly statisticky průkazné, $P < 0,05$ (ANOVA, Fisherův *post hoc* LSD test; Obr. 22).



Obrázek 20: Úbytek abundance ECM zástupců po ukončení toku asimilátu.

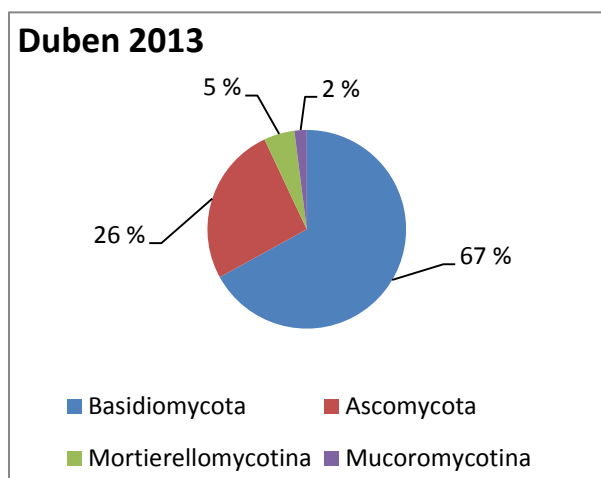


Obrázek 21: Nárůst saprotrofních zástupců v K, R a B po ukončení toku asimilátů.

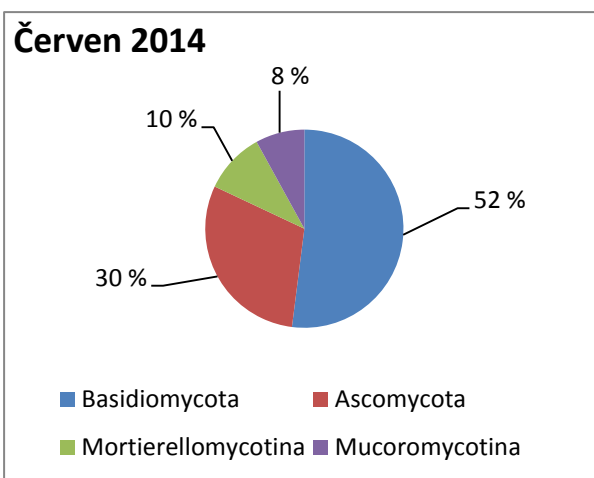


Obrázek 22: Zastoupení ECM a saprotrofních zástupců v K, R a B pro IV/2013 a VI/2014 odběr. Zachován trend (obr. 20 a 21) Nárůst saprotrofních zástupců ve všech třech kompartmentech.

Obr. 23 – 24 znázorňuje relativní četnost houbových oddělení v odběru IV/2013 a VI/2014 (duben 2013 – za přísunu asimilátů, červen 2014 – po ukončení toku asimilátů). Byl zaznamenán úbytek Basidiomycota (o 15 %) a slabý nárůst zástupců z oddělení Ascomycota (4 %). Obě oddělení zahrnují ECM i saprotrofní zástupce, změny v jejich zastoupení však nebyly vyhodnoceny jako významné, signifikantní. V případě saprotrofních zástupců, spadajících pod *Mortierellomycotina* a *Mucoromycotina*, došlo k nárůstu. *Mortierellomycotina* z 5 % na 10 % a v případě *Mucoromycotina* byl nárůst významnější z 2 % na 8 %. Ke zvýšení abundance zástupců hub z těchto pododdělení došlo převážně v R a B, kde byl jejich nárůst vyhodnocen jako signifikantní, avšak v K takovýto nárůst na hladině $P < 0,05$ (ANOVA, Fisherův *post hoc* LSD test) zaznamenán nebyl.



Obrázek 23: Relativní četnost houbových oddělení duben 2013.

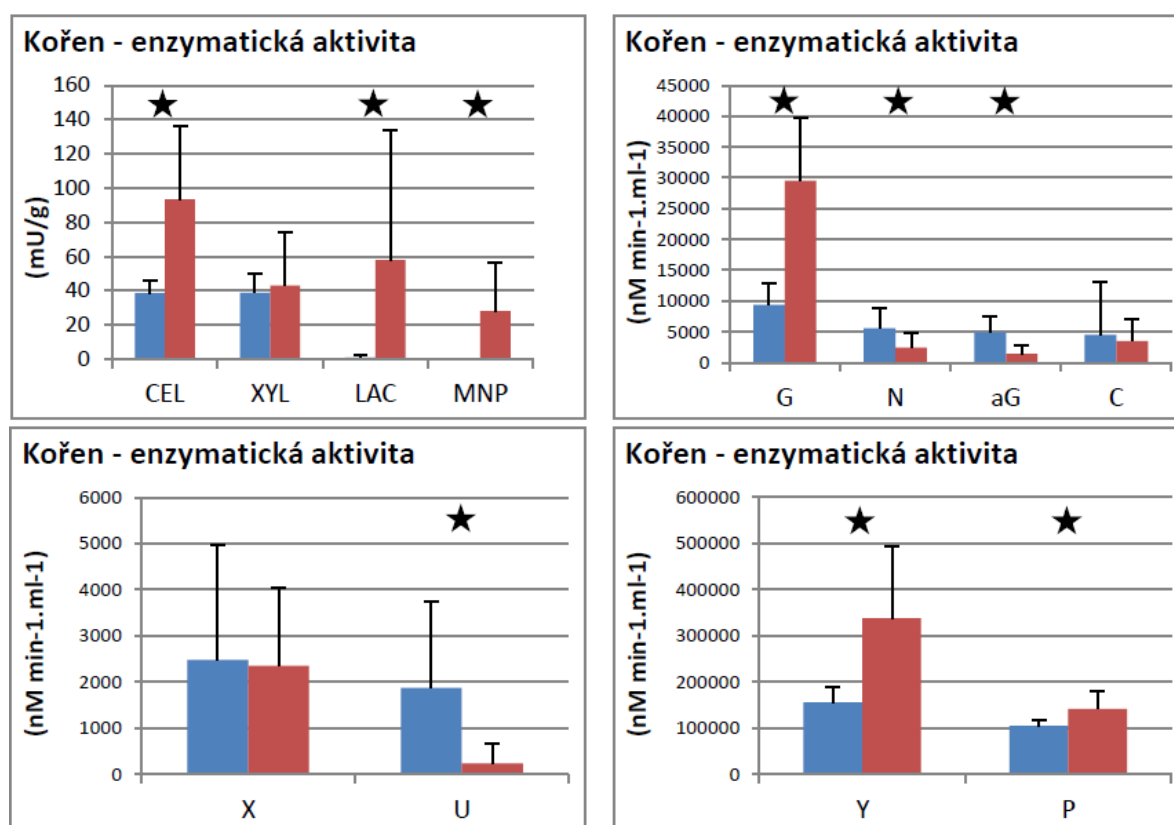


Obrázek 24: Relativní četnost houbových oddělení červen 2014.

5.1.3 Aktivita extracelulárních enzymů přítomných v kořeni, rhizosféře a okolní půdě účastnících se dekompozice látek v nich obsažených

Aktivita degradačních enzymů detekovaných z kořenů byly v případě celulózy, xylanázy, β -glukuronidázy, fosfatázy a α -glukosidázy vyšší v porovnání s rhizosférou a okolní půdou, kde byla naopak vyšší aktivita β -xylosidázy.

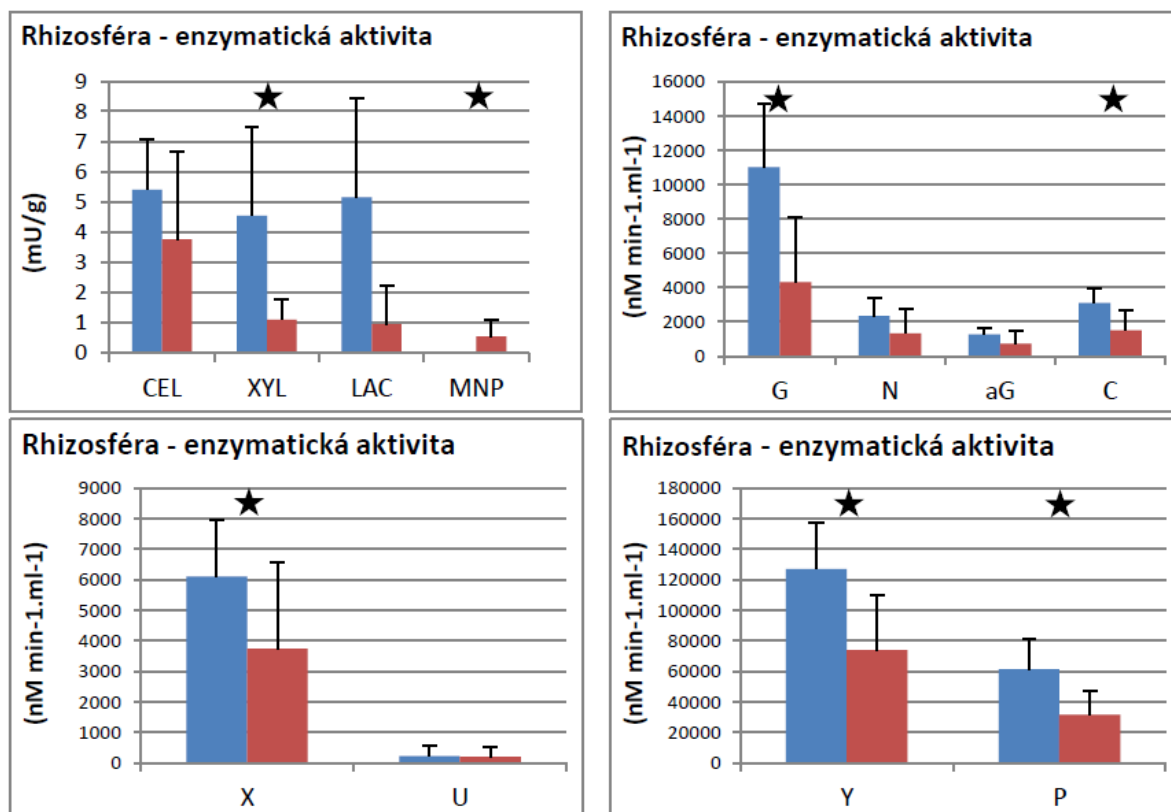
Po ukončení toku asimilátů byl u kořenů zaznamenán významný nárůst aktivity enzymů celulóza, lakáza, Mn-peroxidáza, β -glukosidáza a lipáza, dále došlo také ke zvýšení aktivity enzymů xylanáza a fosfatáza. Naopak u enzymů chitináza, α -glukosidáza, celobiohydroláza, β -xylosidáza, β -glukuronidáza byl zaznamenán pokles aktivity (Obr. 25).



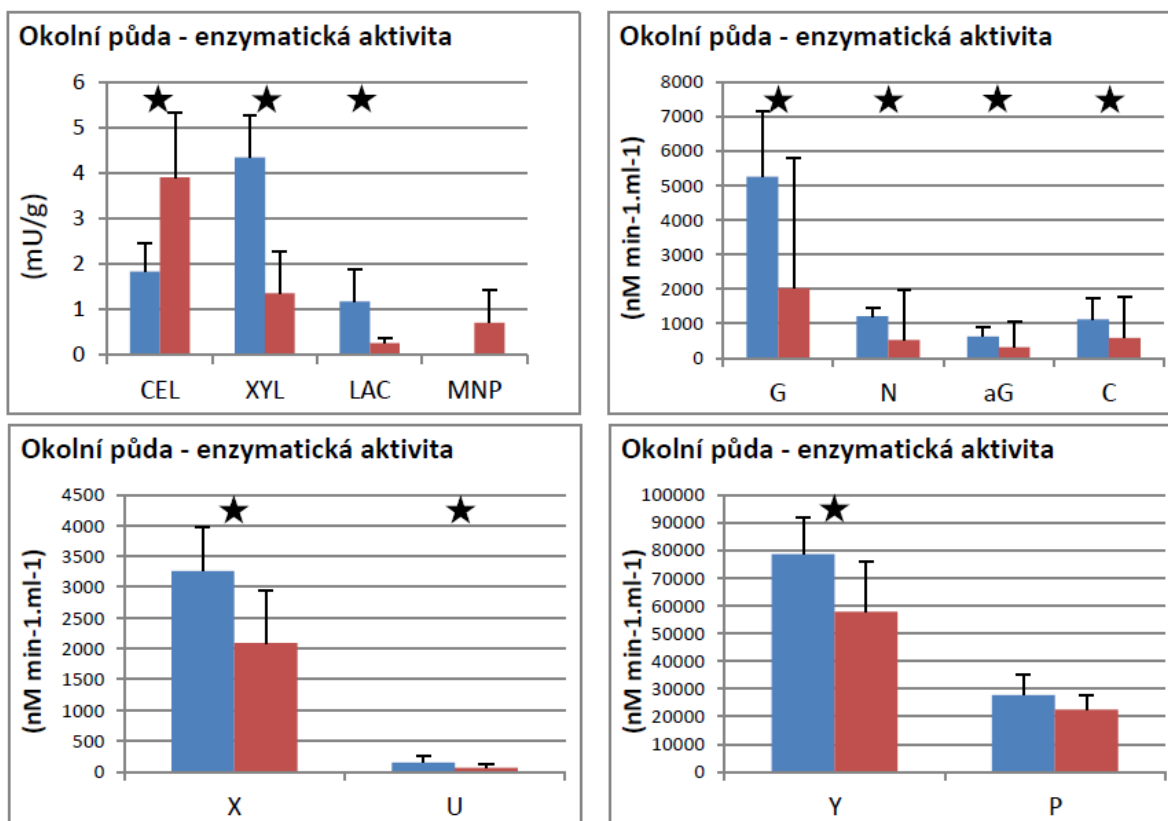
Obrázek 25: Aktivita vybraných enzymů v kořeni. Změny enzymatické aktivity vyhodnocené jako signifikantní ★ na $P < 0,05$ (ANOVA, Fisherův *post hoc* LSD test). Cel – celulóza, Xyl – xylanáza, L – lakáza, MnP – mangan peroxidáza, G- β -glukosidáza, N – chitináza, aG – α -glukosidáza, C – celobiohydroláza, X – β -xylosidáza, U – β -glukuronidáza, Y – lipáza, P – fosfatáza. Odběr IV/2013 ■ a VI/2014 ■

V rhizosféře bylo detekováno zvýšení aktivity pouze jednoho z měřených enzymů Mn-peroxidázy. Aktivita ostatních degradačních enzymů (celuláza, xylanáza, lakáza, β -glukosidáza, chitináza, α -glukosidáza, celobiohydroláza, β -xylosidáza, lipáza a fosfatáza) klesla.

Zvýšení enzymatické aktivity Mn-peroxidázy bylo také zaznamenáno v půdě, kde byl dále zaznamenán nárůst aktivity enzymu celuláza. S výjimkou nárůstu aktivity enzymu celuláza v okolní půdě byl pro rhizosféru a okolní půdu pozorován obdobný trend ve změnách enzymatické aktivity (Obr. 26 - 27). Ve všech třech kompartmentech došlo k nárůstu aktivity enzymu Mn-peroxidáza rok po ukončení toku asimilátů.



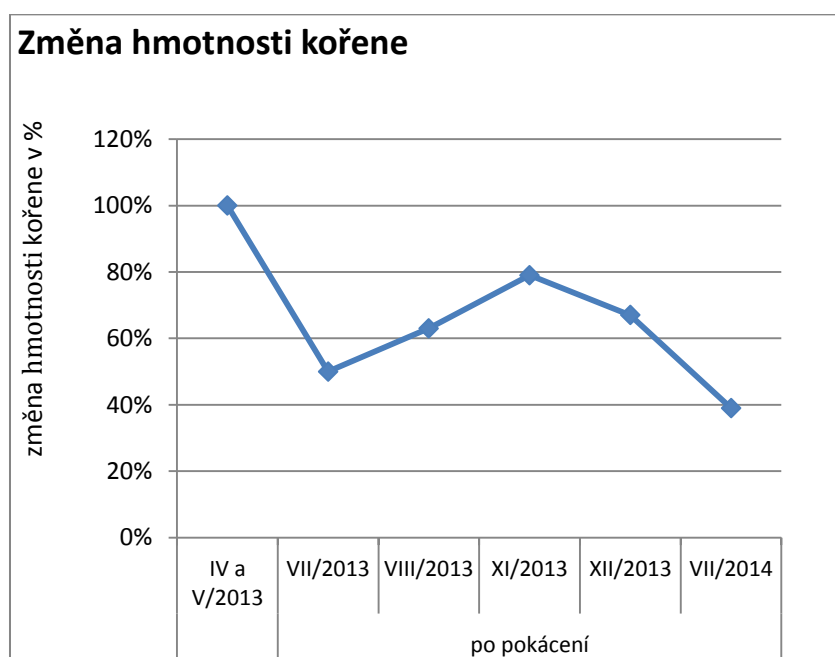
Obrázek 26: Aktivita vybraných enzymů v rhizosféře. Změny enzymatické aktivity vyhodnocené jako signifikantní ★ na $P < 0,05$ (ANOVA, Fisherův *post hoc* LSD test). Cel – celuláza, Xyl – xylanáza, L – lakáza, MnP – mangan peroxidáza, G- β -glukosidáza, N – chitináza, aG – α -glukosidáza, C – celobiohydroláza, X – β -xylosidáza, U – β -glukuronidáza, Y – lipáza, P – fosfatáza. Odběr IV/2013 ■ a VI/2014 ■



Obrázek 27: Aktivita vybraných enzymů v „bulk soil“ - okolní půdě. Změny enzymatické aktivity vyhodnocené jako signifikantní ★ na $P < 0,05$ (ANOVA, Fisherův post hoc LSD test). Cel – celulóza, Xyl – xylánáza, L – lakáza, MnP – mangan peroxidáza, G- β -glukosidáza, N – chitináza, aG – α -glukosidáza, C – celobiohydroláza, X – β -xylosidáza, U – β -glukuronidáza, Y – lipáza, P – fosfatáza. Odběr IV/2013 ■ a VI/2014 ■

5.1.4 Stanovení rychlosti dekompozice kořenů, elementární analýza a stanovení pH dekompozice kořenů

Rychlost dekompozice kořenů byla stanovena na základě porovnání hmotnosti kořenů před a po jejich lyofilizaci. Vzorky z odběrů IV/2013 a V/2013 (za přísunu toku asimilátů) byly použity jako výchozí rozkládající se materiál a představovaly původních 100 % (viz příloha, Tab. 14). Po ukončení toku asimilátů byl zaznamenán úbytek biomasy kořene po 1. měsíci, který však nebyl vyhodnocen jako signifikantní. Jeden rok po ukončení toku asimilátů byl pokles na 39 % z původní biomasy kořene. Postupná změna a celkový úbytek biomasy kořene byl vyhodnocen jako signifikantní (Obr. 28).



Obrázek 28: Postupná změna hmotnosti kořene v procentech původní hmotnosti kořene: Rok po ukončení toku asimilátů bylo degradováno 61% z původní biomasy kořene.

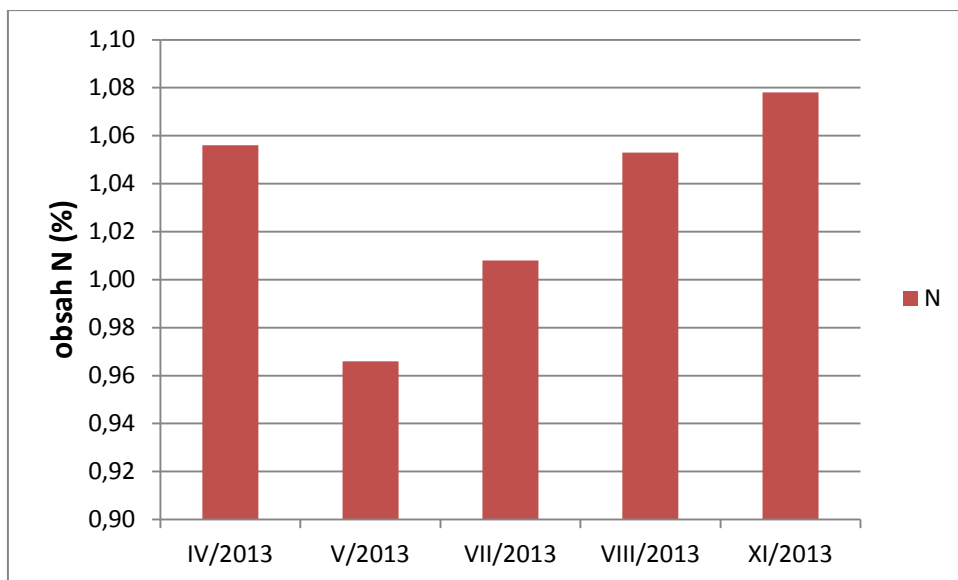
5.1.5 Stanovení pH a elementární analýza

Pro stanovení pH byly vzorky smíseny s H₂O (1:10 w/v). Naměřené hodnoty pH u R a B v postupu času nevykazovaly významné změny. Nejvyšší naměřené hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí 3,77 až 4,85.

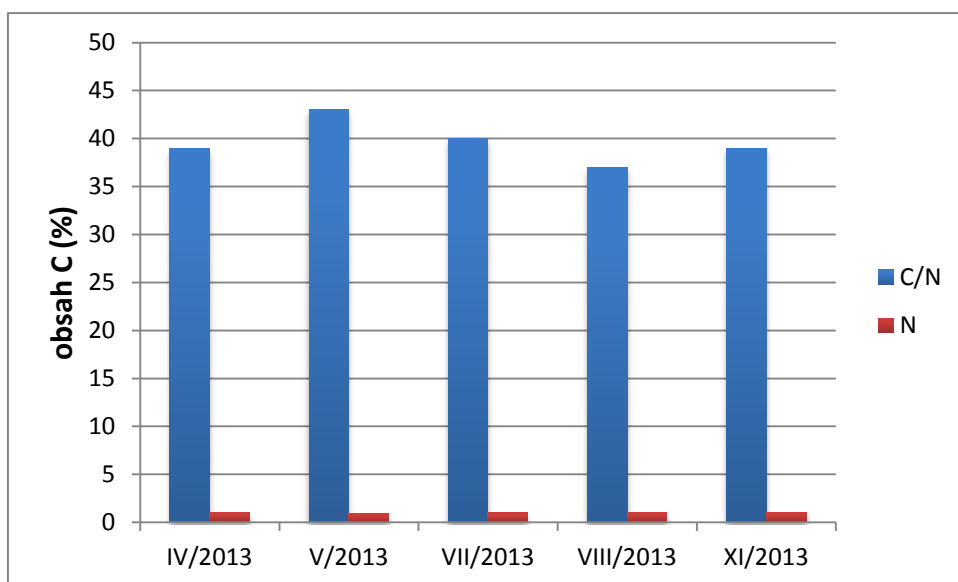
Určení obsahu dusíku (Obr. 29) a poměru C/N (Obr. 30). V odběru IV/2013 za přísunu asimilátů bylo zaznamenáno významně vyšší zastoupení N než v následujícím odběru V/2013, kdy došlo v kořenech k jeho úbytku. Po ukončení toku asimilátů (od odběru VII/213)

byl pozorován postupný nárůst N v kořenech. Obsah N v kořenech z odběrů IV/2013 a XI/2013 (tedy 5 měsíců po ukončení toku asimilátů) se významně nelišily.

I přes jisté výkyvy v zastoupení N signifikantní změny týkající se změn poměrů C/N zaznamenaný nebyly.



Obrázek 29: Obsah dusíku v kořenech



Obrázek 30: Poměr uhlíku a dusíku v kořenech

5.2 Porovnání složení společenstva hub z kořenů 5 a 9 měsíců po ukončení toku asimilátů

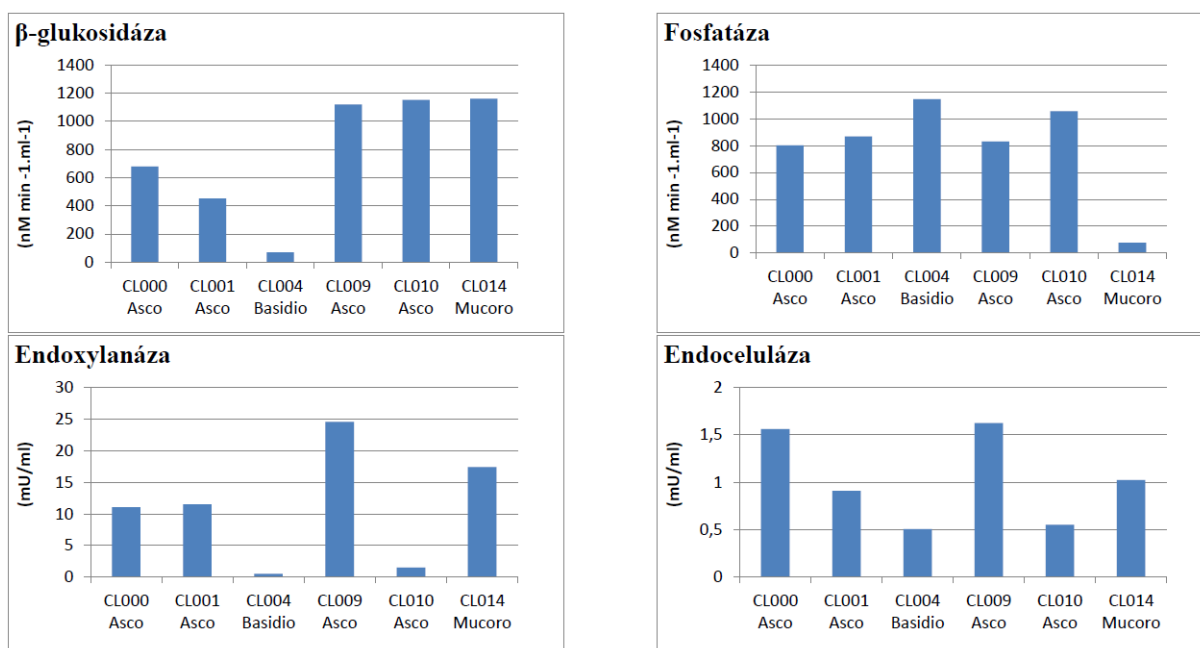
Pro kultivaci hub z kořenů byly provedeny dva odběry 5 a 9 měsíců po pokácení vybraných stromů, místo odběru bylo stejné pro první i druhý pokus. Odebrané kořeny byly vysety na agarové medium MERBS a později přeočkovány na medium ME. Z části narostlé kultury hub byla izolována DNA (Tab. 8) a na základě 97% podobnosti byly izoláty sdruženy do 18 OTU.

Tabulka 8: Zařazení izolátů do OTU, jejich označení v databázi, podobnost, pokrytí s cílovou sekvencí a jejich zařazení do oddělení a počet zástupců.

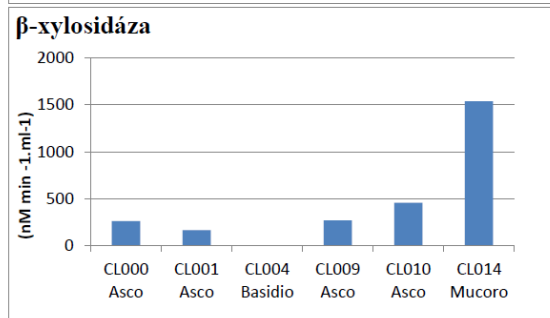
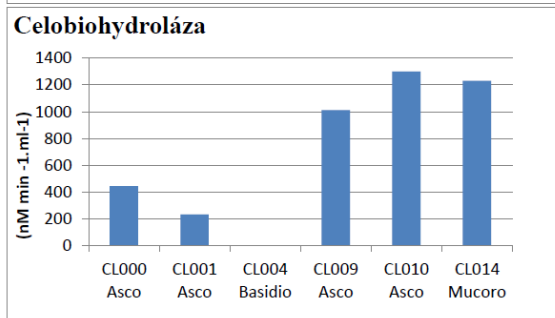
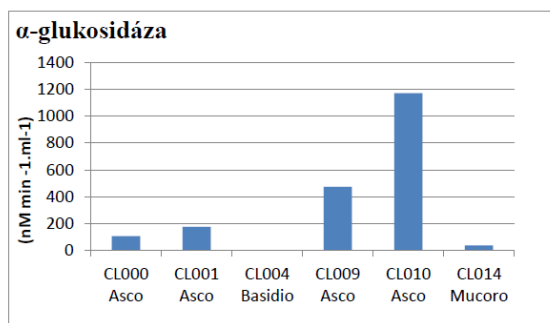
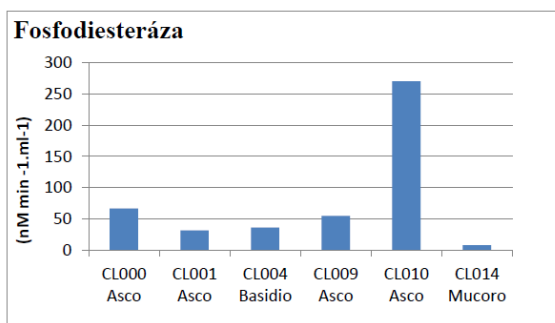
OTU	Označení	Podobnost [%]	Pokrytí [%]	Identifikace	Oddělení	počet zástupců
CL000	JN943354.1	100	100	<i>Hypocrea atroviridis</i>	Ascomycota	98
CL001	JN943444.1	99,1	100	<i>Hypocrea minutispora</i>	Ascomycota	20
CL002	EU280074.1	100	95,9	<i>Hypocrea longipilosa</i>	Ascomycota	16
CL003	KC007135.1	100	100	<i>Neonectria sp.</i>	Ascomycota	12
CL004	JX243939.1	100	100	<i>Trichosporon sp.</i>	Basidiomycoty	3
CL005	AF210665.1	96	99,7	<i>Clonostachys rossmaniae</i>	Ascomycota	3
CL006	AB099509.1	98,9	84,4	<i>Nectria mariannaeae</i>	Ascomycota	3
CL007	AY089746.1	100	100	<i>Verticillium sp.</i>	Ascomycota	2
CL008	EU021609.1	99,9	100	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ascomycota	2
CL009	KC007321.1	100	100	<i>Penicillium sp.</i>	Ascomycota	2
CL010	AF033409.1	100	100	<i>Penicillium lapidosum</i>	Ascomycota	1
CL011	JN943795.1	100	87,6	<i>Mortierella verticillata</i>	Mortierellomycotina	1
CL012	AY442321.1	99,5	100	<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	Ascomycota	1
CL013	AB044645.1	98,6	100	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ascomycota	1
CL014	HQ829165.1	99,6	91,7	<i>Mucor sp.</i>	Mucoromycotina	1
CL015	AB570242.1	100	100	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Ascomycota	1
CL016	AB378554.1	100	100	<i>Pochonia bulbillosa</i>	Ascomycota	1
CL017	JN617682.1	100	100	<i>Penicillium cosmopolitanum</i>	Ascomycota	1
CL018	AF178528.1	99,4	100	<i>Penicillium sp.</i>	Ascomycota	1

Izolovaní zástupci z narostlých kultur spadali převážně do oddělení Ascomycota (*Hypocrea* a *Penicillium*). Dále se podařilo kultivovat a identifikovat 3 zástupce z oddělení Basidiomycota (*Trichosporon sp.*), 1 zástupce z Mucoromycotina (*Mucor sp.*) a 1 zástupce z Mortierellomycotina (*Mortierella verticillata*).

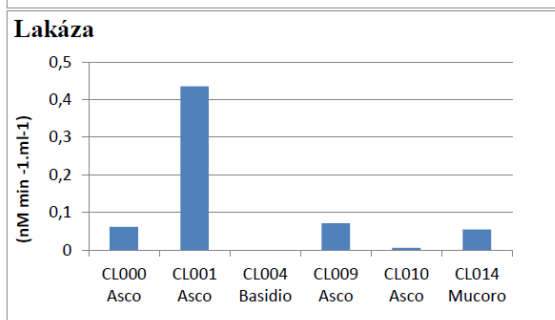
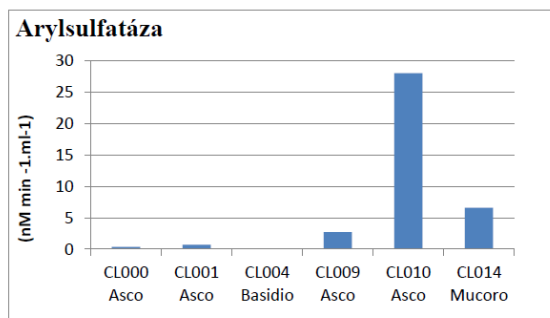
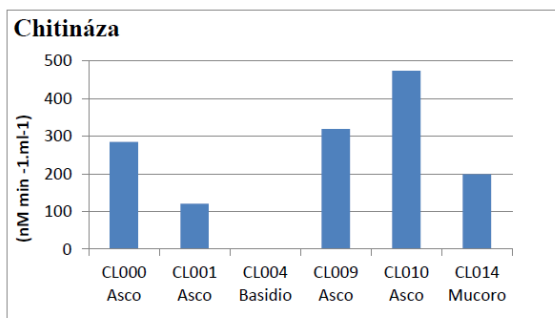
Zástupci jednotlivých OTU byli přeočkováni na kultivační medium ME a dále kultivováni na tekutém mediu obsahujícím celulózu, po dobu 2 týdnů. Poté byla stanovena enzymatická aktivita. Ve všech vzorcích byla detekována aktivita pro enzymy β -glukosidáza, fosfatáza, endoceluláza, endoxylanáza (Obr. 31) a fosfodiesteráza (Obr. 32) která byla v jednotlivých vzorcích různá. S výjimkou zástupců z oddělení Basidiomycota, byla také detekována aktivita pro enzymy α -glukosidáza, celobiohydroláza, β -xylosidáza (Obr. 32) a chitináza (Obr. 33). Aktivita enzymu arylsulfatáza a lakáza (Obr. 33) byla naměřena jen v některých vzorcích u zástupců z oddělení Ascomycota a Mucoromycotina (viz příloha Tab. 11).



Obrázek 31: Grafické znázornění enzymatické aktivity vybraných zástupců, Asco – Ascomycota, Basidio – Basidiomycota, Mucoro – Mucoromycotina. CL000 - *Hypocrea atroviridis*, CL001 - *Hypocrea minutisporum*, CL004 - *Trichosporon sp.*, CL009 - *Penicillium sp.*, CL0010 - *Penicillium lapidosum*, CL014 - *Mucor sp.*



Obrázek 32: Grafické znázornění enzymatické aktivity vybraných zástupců, Asco – *Ascomycota*, Basidio – *Basidiomycota*, Mucoro – *Mucoromycotina*. CL000 - *Hypocrea atroviridis*, CL001 - *Hypocrea minutisporum*, CL004 - *Trichosporon sp.*, CL009 - *Penicillium sp.*, CL0010 - *Penicillium lapidosum*, CL014 - *Mucor sp.*



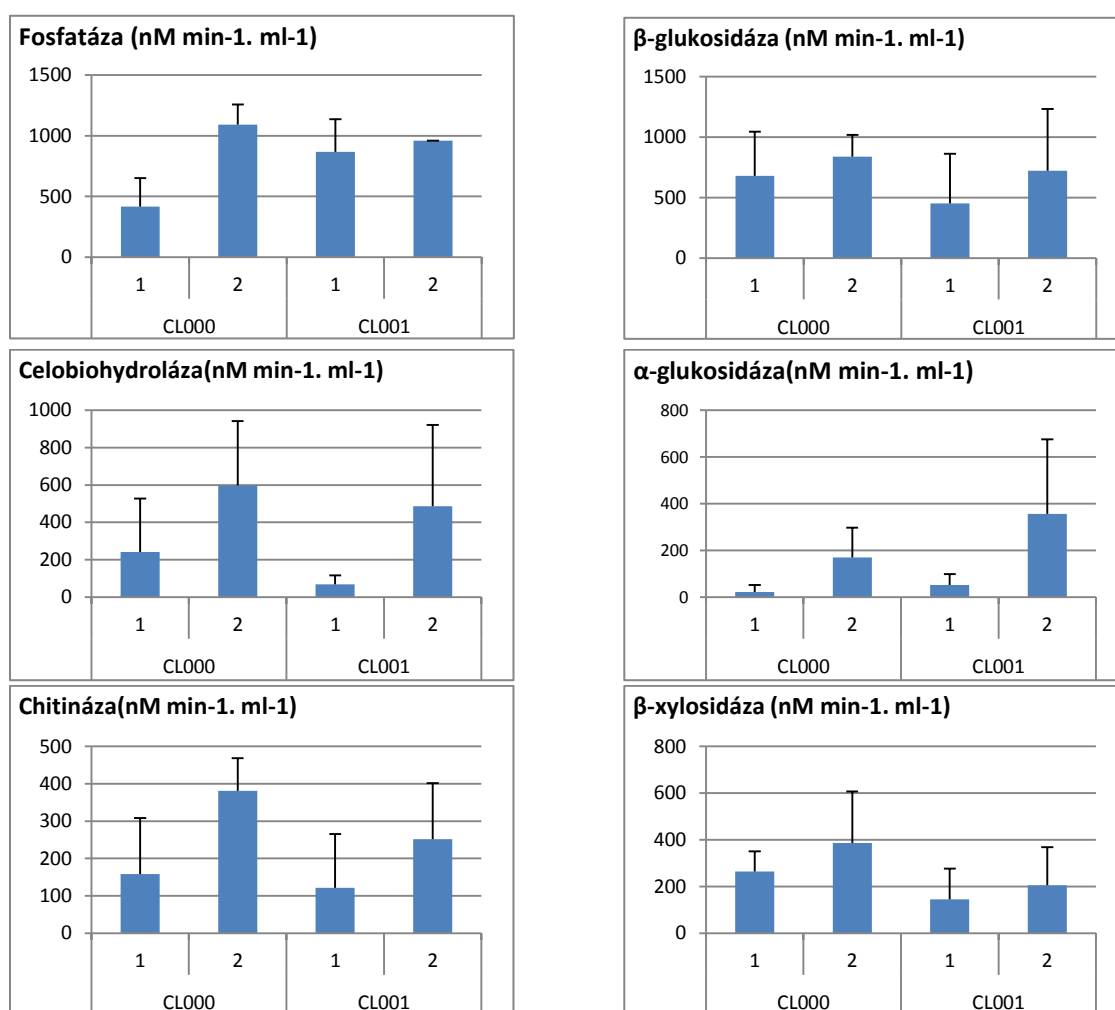
Obrázek 33: Grafické znázornění enzymatické aktivity vybraných zástupců, Asco – *Ascomycota*, Basidio – *Basidiomycota*, Mucoro – *Mucoromycotina*. CL000 - *Hypocrea atroviridis*, CL001 - *Hypocrea minutisporum*, CL004 - *Trichosporon sp.*, CL009 - *Penicillium sp.*, CL0010 - *Penicillium lapidosum*, CL014 - *Mucor sp.*

U dominantně zastoupených OTU CL000 (*Hypocrea atroviridis*) a CL001 (*Hypocrea minutisporum*) z oddělení Ascomycota byla standardně zaznamenána aktivita pro všechny měřené enzymy, s výjimkou arylsulfatáz. Vyšší aktivita tohoto enzymu byla detekována

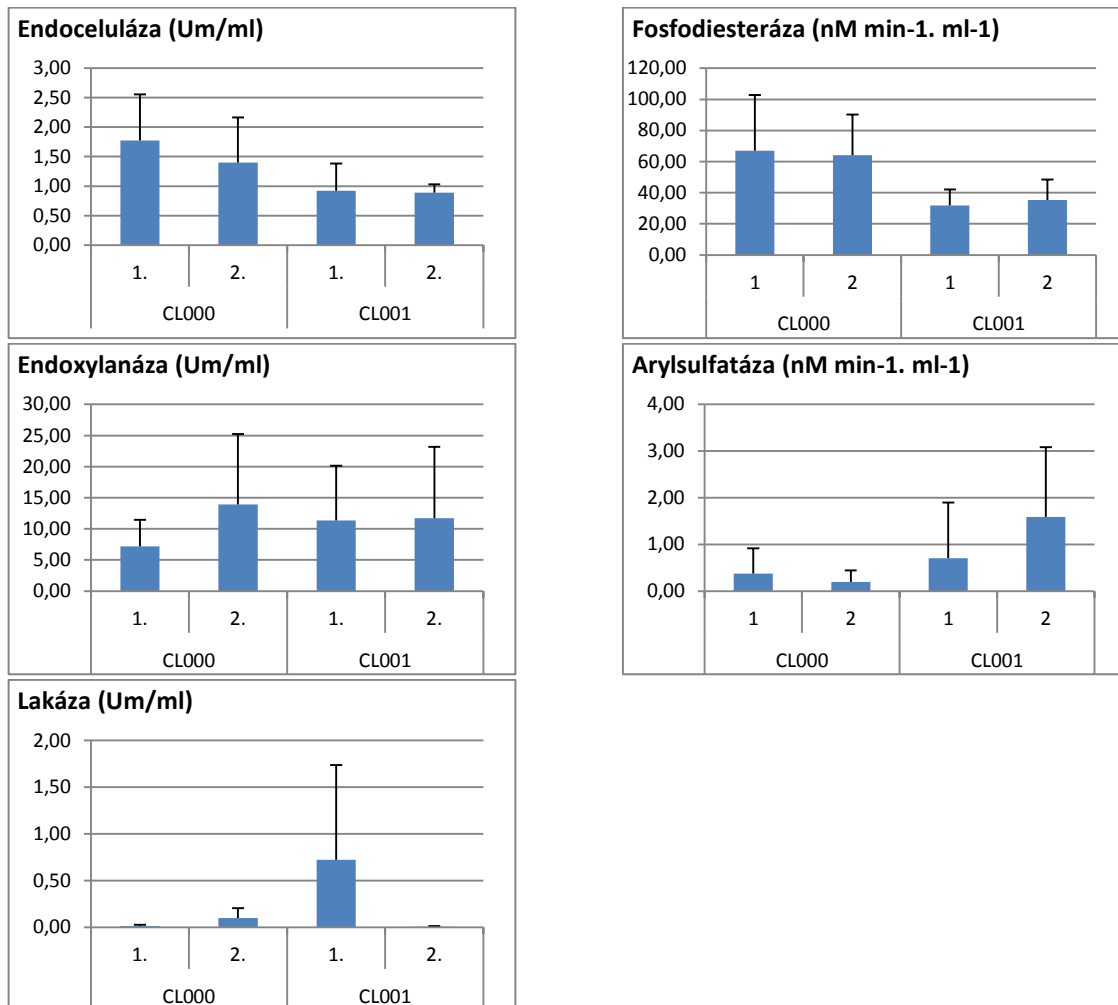
u zástupce CL010 Ascomycota (*Penicillium lapidosum*) a CL003 Ascomycota (*Neonectria sp.*).

Ze všech zástupců byla u CL004 Basidiomycota (*Trichosporon sp.*) detekována nejvyšší aktivita pro enzym fosfatáza. V případě CL014 Mucoromycotina (*Mucor sp.*) se jednalo o enzym β -xylosidázu. (viz příloha Tab. 11).

Porovnání 5 měsíců (1. odběr) a 9 měsíců (2. odběr) po ukončení toku asimilátů u hlavních dominantně zastoupených OTU CL000 (*Hypocrea atroviridis*) a CL001 (*Hypocrea minutisporum*) řazené do oddělení Ascomycota (Obr. 34 – 35).



Obrázek 34: Porovnání enzymatické aktivity - pro enzymy fosfatáza, β -glukosidáza, celobiohydroláza, α -glukosidáza, chitináza a β -xylosidáza 5 měsíců (1.) a 9 měsíců (2.) po ukončení toku asimilátů u dominantně zastoupených OTU (CL000 – *Hypocrea atroviridis* a CL001 – *Hypocrea minutisporum*).



Obrázek 35: Porovnání enzymatické aktivity pro enzymy fosfatáza, β -glukosidáza, celobiohydroláza, α -glukosidáza, chitináza a β -xylosidáza 5 měsíců (1.) a 9 měsíců (2.) po ukončení toku asimilátů u dominantně zastoupených OTU (CL000 – *Hypocrea atroviridis* a CL001 – *Hypocrea minutisporum*).

Enzym fosfatáza byl jediným enzymem, u kterého byla detekována významná změna jeho aktivity ($P < 0,05$ ANOVA, Fischerův *post hoc* LSD test). Byla také zaznamenána vyšší aktivita pro enzymy β -glukosidáza, celobiohydroláza, α -glukosidáza, chitináza a β -xylosidáza. Naopak pro enzym endoceluláza byl zaznamenán pokles v její aktivitě a u enzymu fosfodiesterázy nebyla zaznamenána změna v aktivitě ani u jednoho dominantně se vyskytujícího zástupce. Pro CL000 byl zaznamenán nárůst aktivity enzymů endoxylanáza a lakáza, v případě zástupce CL001 došlo k nárůstu aktivity pro arylsulfatáza, naopak aktivita enzymu lakáza se klesla.

Diskuze

Houby představují významnou součást mikrobiální populace v lesních ekosystémech a mají zásadní význam pro dekompozici lignocelulózového komplexu, kdy dochází k rozkladu organických látek na látky anorganické, které přecházejí do okolního prostředí a jsou znovu začleňovány do organických látek. Houby tak mají zásadní význam v koloběhu C, N, P, ale i dalších prvků. Jako hlavní rozkladači jsou uváděny houby saprotrofní (Klán, 1989). V poslední době se poukazuje na degradační schopnosti ECM zástupců a to na základě produkce extracelulárních enzymů, jejichž aktivita se zvyšuje v období snížené dodávky fotosyntátů ze strany hostitelských rostlin (Baldrian, 2009b), kdy v případě ukončení toku asimilátů jsou nuceny se přizpůsobovat změnám v dostupnosti látek. Vzhledem k tomu, že ECM představují až 1/3 z celkové mikrobiální populace (Högberg a Högberg 2002), zdá se být jejich význam v ekosystému zásadní i po ukončení toku asimilátů.

Za přísunu asimilátů převládají metabolicky aktivní ECM houby (Buée *et al.*, 2009), oproti kterým jsou saprotrofní druhy v kořenech živých stromů méně konkurence schopní (Lindahl *et al.*, 2007). To je patrné z výsledků, kdy zastoupení ECM hub bylo významné v kořenech *Picea abies* právě za přísunu asimilátů. V rhizosféře, která byla pod přímým vlivem kořenových exsudátů, bylo složení obdobné, jako v okolní půdě „bulk soil“. Byly zde zastoupeny jak ECM, tak saprotrofní zástupci, u kterých se zdá, že i v půdě je jejich konkurence schopnost v důsledku toku asimilátů ovlivněna. Po ukončení toku asimilátů došlo k významnému nárůstu saprotrofních hub, analogicky jako po odumření stromového patra po kůrovcové kalamitě (Štursová *et al.*, 2014). Za přísunu asimilátů je celkové složení komunity hub a zastoupení biomasy v rhizosféře významně vyšší v porovnání s okolní půdou. Což potvrzují i výsledky předchozích prací (Prescott a Grayston, 2013). Poměr ECM a saprotrofních druhů za přísunu asimilátů byl však obdobný ve všech kompartmentech, kdy ECM představovaly přibližně 60 % (kořen – 61 %, rhizosféra – 58 %, okolní půda – 59 %) a saprotrofové 40 % (kořen – 39 %, rhizosféra – 42 %, okolní půda – 41 %).

Před ukončením toku asimilátů byli identifikováni ECM zástupci převážně z oddělení Basidiomycota. Byl identifikován i zástupce z oddělení Ascomycota ECM rod *Cenococcum*, který se obvykle vyskytuje především v hlubších horizontech (Courty *et al.*, 2010b). Rod *Russula* vykazoval z ECM zástupců nejvyšší abundanci, a to i po ukončení toku asimilátů. V rhizosféře a okolní půdě byla zaznamenána vysoká abundance ECM zástupců *Tylospora*.

Vzhledem k tomu, že mnoho ECM zástupců je schopno produkovat širokou škálu extracelulárních enzymů podílející se na mobilizaci živin (Buée *et al.*, 2009) je možné, že mezi enzymaticky aktivní patřily i ECM rody *Russula* a *Tomentella*, které v kořenech vykazovaly vysokou abundanci i po ukončení toku asimilátů. To by bylo v souladu s výsledky jiných skupin, které u těchto druhů detekovaly produkci vybraných enzymů (Mosca *et al.*, 2007).

V půdním prostředí došlo ke snížení zastoupení ECM hub z oddělení Basidiomycota a k nárůstu saprotrofních zástupců z oddělení Ascomycota, pododdělení Mortierellomycotina a Mucoromycotina. Saprotrofní zástupci, kteří se za přísunu asimilátů vyskytovaly v rhizosféře, se částečně skládaly z hub, které byly v malé míře detekovány i v kořenech. U některých saprotrofních zástupců s poměrně vysokou abundancí byla zaznamenána preference pro určitý kompartment (pro kořen – *Mycena* a *Phialocephala*, pro rhizosféru a okolní půdu – *Mortierella* a *Umbelopsis*).

V pozdější fázi rozkladu (cca 3 roky po ukončení toku asimilátů) dochází v půdním prostředí k významnému snížení ECM zástupců (Štursová *et al.*, 2014). Signifikantní úbytek byl v této práci zaznamenán již během prvního roku (pokles ECM v okolní půdě byl zaznamenán z původních 60 % na 16 %, v rhizosféře na 15 % a v kořenech na 2 %).

Na základě vysoké aktivity enzymu β -glukosidázy, účastníci se degradace polysacharidů (Baldrian, 2009a), se zdá, že i rok po ukončení toku asimilátů jsou snadno rozložitelné zdroje stále přítomné.

Degradace látek bývá doprovázena celkovým nárůstem aktivity enzymů nezbytných pro rozklad lignocelulózového komplexu (Baldrian 2009b). Byla detekována aktivita enzymů endoceluláza, β -glukosidáza, chitináza, α -glukosidáza, β -xylosidáza, fosfatáza, lakáza, celobiohydroláza a fosfatáza. Tedy široká škála extracelulárních enzymů hydrolytického a oxidačního charakteru. V půdním prostředí došlo k úbytku biomasy hub a snížení enzymatické aktivity (kromě enzymů endoceluláza a Mn-peroxidáza, jejichž aktivita stoupla). Došlo i ke snížení aktivity enzymu fosfatáza v půdě, což je v rozporu s výsledky práce Štursová a kolektivu (2014), kde naopak stoupá. Byla také detekována aktivita pro enzym chitináza, což koreluje s úbytkem houbové biomasy v půdním prostředí (Štursová *et al.*, 2014). V kořenech naopak došlo k nárůstu enzymatické aktivity většiny enzymů hydrolytického a oxidačního charakteru, jejichž produkce byla detekována u zástupců ECM (Courty *et al.*, 2010b).

Degradační vlastnosti vykazují např. rody *Russula* a *Tomentella* (Mosca *et al.*, 2007; Courty *et al.*, 2010b) a také *Cortinarius*, kteří byli v kořenech, rhizosféře a okolní půdě zastoupeni dominantně. Jedná se o ekologicky významné, ale nekultivovatelné druhy (*Russula spp.*, *Cortinariuns spp.* a dále také *Lactarius spp.*), o kterých je z hlediska ekofyziologie dostupno jen malé množství informací.

ECM po ukončení toku asimilátu tedy vymizí, nebo mohou přejít na saprotrofní způsob života (Štursová *et al.*, 2014). Na základě produkce enzymu lakáza, který se účastní degradace ligninu a jehož produkce byla potvrzena pro ECM rody *Russula spp.*, *Xerocomus spp.* a *Lactarius spp.* (Luis *et al.*, 2005) a peroxidázy u zástupců rodu *Cortinarius* (Bödeker *et al.*, 2009) je možné, že alespoň z malé části se tito zástupci v 1. měsíci po ukončení toku asimilátů účastní na degradaci ligninu. Pro to by svědčila zvýšená aktivita enzymu lakáza již jeden měsíc po ukončení toku asimilátů a stále vysoké abundance zástupců ECM hub.

Zvýšení enzymatické aktivity ze strany ECM může být především z důvodu opuštění odumírajícího kořene a vlastní degradace je pouze vedlejším účinkem (Cullings *et al.*, 2008), kdy dochází k degradaci celulózy, využití organických fosfátů (fosfatáza) a oxidace fenolů. Byl také detekován nárůst aktivity enzymu fosfatáza v kořenech a jeho úbytek v půdním prostředí, což potvrzuje teorii o vyhledávání nového hostitele, kdy se využívají živiny z odumírajícího kořene, které jsou dodávány do extramatrikálního mycelia. Současně vyšší aktivita enzymu β -glukosidázy poukazuje na získání C ze snadno rozložitelných látek (Baldrian, 2009a). Výše uvedené bylo potvrzeno i izolací zástupce *Trichosporon* a jeho vysoké aktivity pro enzym fosfatázu.

U dominantně izolovaného zástupce *Hypocrea (Trichoderma)* byla zaznamenána zvýšená aktivita nejen enzymu fosfatázy, ale i dalších měřených enzymů s výjimkou arylsulfatáz. Bylo potvrzeno, že se jedná o běžný půdní saprotrofní druh, který kolonizuje epidermis kořene, či proniká do jeho vnitřních částí. Svým působením je schopen zajistit zvýšenou rezistenci vůči abiotickým stresům, zvyšovat produktivitu rostlin, příjem a využití živin (Harman *et al.*, 2004). Jedná se o druh, který produkuje enzymy nezbytné pro degradaci hemicelulózy, jako jsou xylanázy a mannázy (Franco *et al.*, 2004).

Předpokládala se i izolace některých zástupců *Penicillium*, kteří obecně vykazují vyšší aktivitu pro enzymy celulózy. Pro další mikroskopické houby je detekovaná aktivita vybraných enzymů pro degradaci hemicelulózy (α -galaktosidázy, β -galaktosidázy, α -mannosidázy) obvykle nízká (Žifčáková a Baldrian, 2011). V případě *Penicillium* byla

potvrzena vyšší aktivita enzymů β -glukosidázy, α -glukosidázy a celobiohydrolázy. Byla také zaznamenána vysoká aktivita pro enzym arylsulfatázy.

Ve srovnání se saprotrofními bazidiomycety ze stejného prostředí ukázaly ascomycota obdobné celulólytické schopnosti a vyšší chitinázovou aktivitu. Jejich aktivní role v rozkladu jak lignocelulózy, tak mrtvé biomy hub je významná v koloběhu látek a C (Žifčáková a Baldrian 2011).

Vysoká aktivita enzymu Mn-peroxidáza, typická především pro saprotrofní zástupce z oddělení Basidiomycota (Morgenstern *et al.*, 2008), byla detekována i v případě ECM *Tylospora* (Chen *et al.*, 2003) a to déle, jak půl roku po ukončení toku asimilátů ve všech třech kompartmentech, především však v kořenech. Jeho aktivita u ECM zástupců může být negativně ovlivněna v důsledku zvýšeného množství amonných iontů (Bödeker *et al.*, 2014). Tomu by mohla odpovídat i zvýšená aktivita z odběru v květnu 2013 za přísunu asimilátů. V tomto odběru bylo vysoké zastoupení ECM zástupců a naopak procentuální úbytek N v kořenech, kdy ECM pravděpodobně zajišťovaly tento limitující prvek pro svého hostitele.

Zvýšená aktivita Mn-peroxidázy nejspíše není preferenční z důvodu získání C, ale N (Bödeker *et al.*, 2014), který mykorrhizní houby zpřístupňují pro své hostitelské rostliny (Buée *et al.*, 2009). Jeden měsíc po ukončení toku asimilátu se jeho aktivita snížila a došlo k nárůstu aktivity enzymů degradující snadno rozložitelné zdroje. pH půdy bylo zachováno na optimálních nižších hodnotách pro tyto degradační enzymy a pohybovalo se v rozmezí 3 až 4.

V práci Bending a Read (1996) se poukazuje na schopnost produkce polyfenol-degradující enzymy ECM houbami, které tak jistě hrají významnou roli v mobilizaci na dusík bohatých sloučenin v kyselých organických půdách, kde dochází ke zvyšování poměru C/N se stářím lesa (Lindah *et al.*, 2007). Celkově se zdá, že pro ECM zástupce je výhodné zahájit degradační procesy jako první. Jedná se však o vedlejší účinek, kdy se houby snaží opustit svého odumírajícího hostitele. Živiny, které jsou získány během degradace, jsou posílány do extracelulárního mycelia, kterým prohledávají půdní prostředí a tak vyhledávají nového hostitele. To bylo potvrzeno zvýšenou aktivitou fosfatáz v kořenech, kde dochází k nárůstu aktivity i dalších enzymů (Cullings *et al.*, 2008).

ECM zástupci produkují poměrně širokou škálu extracelulárních degradačních enzymů. To jim zajišťuje vysokou univerzálnost a rychlé přizpůsobení měnícím se podmínkám na základě odlišné dostupnosti uhlíku a v případě ukončení toku asimilátů jsou schopné rychlé reakce na měnící se podmínky (Talbot *et al.*, 2008). Zástupci hub v kořenech a půdním

prostředí vykazovali obdobné složení beta diverzity, kdy podzemní houbové komunity byly prostorově strukturované a ke změně docházelo na základě změny dostupnosti organické hmoty – tedy labilní či obtížně rozložitelné formě uhlíku a dusíku.

Extracelulární enzymy však typicky produkují saprotrofní zástupci, kteří jsou hlavními dekompozitory. Jedná se především o zástupce z pododdělení Basidiomycota produkující vyšší aktivitu všech měřených enzymů. Bývá u nich detekována např. fosfatáza, β -glukosidáza, N-acetylglukosaminidáza. Zatímco jiné enzymy, jako hemicelulázy či lakázy obvykle v takové míře produkovány nejsou. Obecně zástupci z oddělení Basidiomycota v porovnání se zástupci z oddělení Ascomycota vykazují vyšší aktivitu všech enzymů, s výjimkou alkalické fosfatázy, α -glukosidázy, N-acetylglukosaminidázy, α -mannosidázy a α -fukosidázy (Eichlerová *et al.*, 2015).

V porovnání se zástupci hub kolonizující nadzemní části stromu (*Picea abies*) – jehlice a následně opad (svrchní horizonty půdy) se stejně, jako v případě ECM jedná především o houby z oddělení Basidiomycota a Ascomycota, kdy u těchto zástupců byly detekovány enzymy celobiohydroláza, β -glukosidáza, β -xylosidáza, N-acetylglucosaminidáza, glukosidázy, fosfatázy a arylsulfatázy. Většina jich produkuje také endocelulázu, endoxylanázu a lakázu (Žiřňáková *et al.*, 2011). Většina těchto nadzemních dekompozitorů produkuje také hemicelulázy. Jediný rozdíl, avšak významný, je v produkci Mn-peroxidázy. Tento enzym v případě degradace jehlic a opadu byl zaznamenán pouze u některých hub, výhradně z oddělení Basidiomycet.

Z literárních zdrojů vyplývá, že někteří zástupci ECM produkují extracelulární enzymy, které jsou nezbytné pro degradaci snadno a obtížněji rozložitelných látek. Tyto enzymy využívají pro degradaci kořenových exsudátů, případně pro rozložení lignocelulózového komplexu a následné opuštění kořene svého hostitele. Pomocí těchto enzymů mohou využívat C z půdního prostředí jako alternativního zdroj v případě nízkého příjmu C z asimilátů od jejich hostitele. ECM mají velký význam v rozkladu a koloběhu látek.

I přesto, že výsledky mnohých studií podporují zapojení ECM hub do rozkladu organické hmoty (Bödeker *et al.*, 2014). Mechanismy, které ovlivňují procesy degradace v boreálních lesích – degradaci lignocelulózového komplexu a humusu, kdy dochází k mobilizaci organické hmoty a živin, dosud nejsou dostatečně prozkoumány (Baldrian, 2009b).

Souhrn

- Za přísunu asimilátů bylo nejvyšší zastoupení biomasy hub v kořenech (ECM 61 %), kde převažoval rod *Russula*. V rhizosféře (ECM 58 %) a půdě (ECM 59 %) převažovaly rody *Russula* a *Tylospora*.
- Po ukončení toku asimilátů došlo k nárůstu saprotrofních zástupců (kořen 98 %, rhizosféra 85 %, půda 84 %). Bylo zaznamenáno celkové zvýšení biomasy hub a snížení její diverzity v kořenech a naopak její signifikantní úbytek a nárůst diverzity hub v rhizosféře a půdě.
- Rok po ukončení toku asimilátů došlo k poklesu suché hmotnosti kořenů o 61 %.
- Byla zaznamenána preference některých saprotrofních zástupců pro určitý kompartment. Pro kořen vykazovaly preferenci rody *Mycena* a *Phialocephala*. Pro rhizosféru a půdu byla detekována preference u rodů *Mortierella*, *Umbelopsis* a *Cryptococcus*.
- Po ukončení toku asimilátů se snížila abundance původně hojně se vyskytujících zástupců z oddělení Basidiomycota (z 67 % na 52 %) a došlo k nárůstu Ascomycota (z 26 % na 30 %) a k významnému nárůstu Mortierellomycotina (z 5 % na 10 %) a Mucoromycotina (z 2 % na 8 %).
- V kořenech došlo ke zvýšení aktivity některých degradačních enzymů - především celulóza, lakáza, β -glykosidáza a lipáza. Naopak v rhizosféře a půdě se aktivita většiny degradačních enzymů snížila. Výjimkou je Mn-peroxidáza, jejíž aktivita se zvýšila ve všech třech kompartmentech.
- V kořenech po ukončení toku asimilátů došlo ke snížení obsahu N a tedy ke zvýšení poměru C/N, který však do půl roku po ukončení toku asimilátů byl srovnatelný s původním poměrem C/N za přísunu asimilátů.
- Kultivací kořenů bylo získáno 18 různých zástupců hub, u kterých byla detekována různá aktivita pro různé degradační enzymy.
- Nejvyšší abundanci vykazovaly zástupci z oddělení Ascomycota: *Hypocrea atroviridis* a *Hypocrea minutispora*, u kterých byla detekována průměrná enzymatická aktivita pro všechny měřené degradační enzymy. U hojně se vyskytujícího zástupce *Neonectria sp.* Byla zaznamenána vysoká aktivita enzymu arylsulfatáza.

- Zástupci s výrazně nižší abundancí ojediněle vykazovaly srovnatelnou enzymatickou aktivitu, jako hojně se vyskytující *H.atroviridis* a *H.minutispora*. u jiných byla zaznamenána vyšší produkce určitého enzymu a tedy jeho specifita.
- V případě zástupce *Trichosporon sp.* (Basidiomycota) byla detekována vysoká aktivita pro enzym fosfatáza. U *Penicillium lapidosum* (Ascomycota) byla vysoká aktivita pro enzym arylsulfatáza a u *Mucor sp.* (Mucoromycotina) byla naměřena vysoká aktivita enzymu β -xylosidáza.

Seznam literatury

- Ashford, S. J. (1986). "Feedback-seeking in individual adaptation: A resource perspective." *Academy of Management Journal* 29(3):465–487.
- Asiegbu, F. O., Daniel, G., Johansson, M. (1996). "Cellular interaction between the saprotroph *Phlebiopsis gigantea* and non-suberized roots of *Picea abies*." *Mycological Research* 100:409-417.
- Bailey, V. L., Smith, J. L., Bolton, H. (2002). "Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration." *Soil Biology & Biochemistry* 34(7):997–1007.
- Baldrian, P. (2009a). "Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis." *Plant Soil and Environment* 55(9):370–378.
- Baldrian, P. (2006). "Fungal laccases - occurrence and properties." *FEMS Microbiology Reviews* 30(2):215-242.
- Baldrian, P. a Valášková, V. (2008). "Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi." *FEMS Microbiology Reviews* 32(3):501-521.
- Baldrian, P. (2008). "Enzymes of Saprotrophic Basidiomycetes." Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. Book Series: *British Mycological Society Symposium Series* 28:19–41.
- Baldrian, P. (2009b). "Ectomycorrhizal fungi and their enzymes in soils: is there enough evidence for their role as facultative soil saprotrophs?." *Oecologia* 161(4):657–660.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Žifčáková, L., Šnajdr, J., Rídlo, J., Vlček, C. *et al.* (2012). "Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition." *ISME Journal* 6(2):248–258.
- Bending, G. D. a Read, D. J. (1996). "Nitrogen mobilization from protein polyphenol complex by ericoid and ectomycorrhizal fungi." *Soil Biology & Biochemistry* 28(12):1603–1612.
- Bending, G. D. a Read, D. J. (1995). "The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter." *New Phytologist* 130(3):401–409.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayer, E. W. (2009). "GenBank." *Nucleic Acids Research* 37:26–31.
- Berbee, M. L. a Taylor, J. W. (1993). "Dating the evolutionary radiations of the true fungi." *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique* 71(8):1114–1127.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M. (2012). "The rhizosphere microbiome and plant health." *Trends in Plant Science* 17(8):478-486.

- Birsan, C., Johnson, P., Joshi, M., MacLeod, A., McIntosh, L., Monem, V., Nitz, M., Rose, D. R., Tull, D., Wakarchuck, W. W., Wang, Q., Warren, R. A. J., White, A., Withers, S. G. (1998). "Mechanisms of cellulases and xylanases." *Biochemical Society Transactions* 26(2):156–160.
- Blanchette, R. A. (1991). "Delignification of wood by decay fungi." *Annual Review of Phytopathology* 29:381-398.
- Bödeker, T. M., Clemmensen, K. E., de Boer, W., Martin, F., Olson, A., Lindahl, B. D. (2014). "Ectomycorrhizal Cortinarius species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems." *New Phytologist* 203(1):245–256.
- Bödeker, I. T. M., Nygren, C. M. R., Taylor, A. F. S., Olson, A., Lindahl, B. (2009). "ClassII peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi." *ISME Journal* 3(12):1387-1395.
- Buée, M., de Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E. (2009). "The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors." *Plant and Soil* 321(1-2):189–212.
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J. (2005). "Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes." *Mycorrhiza* 15(4):235–245.
- Buée, M., Courty, P. E., Mignot, D., Garbaye, J. (2007). "Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community." *Soil Biology & Biochemistry* 39:1947–1955.
- Callaway, R. M. a Aschehoug, E. T. (2000). "Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion." *Science* 290(5491):521–523.
- Courty, P. E., Breda, N., Garbaye, J. (2007). "Relation between oak tree phenology and the secretion of organic matter degrading enzymes by *Lactarius quietus* ectomycorrhizas before and during bud break." *Soil Biology & Biochemistry* 39(7):1655–1663.
- Courty, P. E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Klett, P. F., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M. P., Uroz, S., Garbaye, J. (2010a). "The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts." *Soil Biology & Biochemistry* 42(5):679–698.
- Courty, P. E., Franc, A., Garbaye, J. (2010b). "Temporal and functional pattern of secreted enzyme activities in an ectomycorrhizal community." *Soil Biology & Biochemistry* 42(11):2022–2025.
- Courty, P. E., Pouysegur, R., Buée, M., Garbaye, J. (2006). "Laccase and phosphatase activities of the dominant ectomycorrhizal types in a lowland oak forest." *Soil Biology & Biochemistry* 38:1219–1222.
- Courty, P. E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J. (2005). "Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests." *New Phytologist* 167:309–319.

- Cullings, K., Ishkhanova, G., Henson, J. (2008). "Defoliation effects on enzyme activities of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus* in a *Pinus contorta* (lodgepole pine) stand in Yellowstone National Park." *Oecologia* 158 (1):77–83.
- Curl, E. A. a Truelove, B. (1986). "The rhizosphere." (Advanced Series in Agricultural Sciences, Vol. 15) *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo*, ISBN 3–540–15803–0.
- de Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C., Boddy, L. (2005). "Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development." *FEMS Microbiology Reviews* 29(4):795–811.
- del Giorgio, P. A. a Cole, J. J. (1998). "Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems." *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:503–541.
- Dickie, I. A., Xu, B., Koide R. T. (2002). "Vertical niche differentiation of endomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis." *New Phytologist* 156(3):527–535.
- Duffy, B., Schouten, A., Raaijmakers, J. M. (2003). "Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism." *Annual review ecology and systematics* 41:501–538.
- Edgar, R. C. (2010). "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST." *Bioinformatics* 26(19):2460–2461.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Žifčáková, L., Lisá, L., Dobiášová, P., Baldrian, P. (2015). "Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi." *Fungal Ecology* 13:10–22.
- Estabrook, E. M. a Yoder, J. I. (1998). "Plant-plant communications: Rhizosphere signaling between parasitic angiosperms and their hosts." *Plant Physiology* 116(1):1–7.
- Fierer, N. a Jackson, R. B. (2006). "The diversity and biogeography of soil bacterial communities." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(3):626–631.
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R. *et al.* (2007). "Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil." *Applied and Environmental Microbiology* 73(21):7059–7066.
- Finlay, R. D. (2008). "Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium." *Journal of Experimental Botany* 59(5):1115–1126.
- Flores, H. E., Vivanco, J. M., Loyola-Vargas, V. M. (1999). "Radicle" biochemistry: the biology of root-specific metabolism." *Trends in Plant Science* 4(6):220–226.
- Franco, P. F., Ferreira, H. M., Ferreira, E. X. (2004). "Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40:255–259.

- Frank, B. (2005). "On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A. B. Frank's classic paper of 1885)." *Mycorrhiza* 15(4):267–275.
- Frey, S. D., Elliott, E. T., Paustian, K., Peterson, G. A. (2000). "Fungal translocation as a mechanism for soil nitrogen inputs to surface residue decomposition in a no-tillage agroecosystem." *Soil Biology & Biochemistry* 32(5):689–698.
- Frey-Klett, P. a Garbaye, J. (2005). "Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungalebacterial interactions." *New Phytologist* 168(1):4-8.
- Gabriel, J., Baldrian, P., Rychlovský, P., Krenzelok, M. (1997). "Heavy Metal Content in Wood-decaying fungi collected in Prague and in the National Park Šumava in the Czech Republic." *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 59(4):595–602.
- Garbaye, J. (1994). "Tansley review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis." *New Phytologist* 128(2):197–210.
- Gardes, M. a Bruns, T. D. (1993). "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Molecular Ecology* 2(2):113–118.
- Gogala, N. (1991). "Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi." *Experientia* 47(4):331–340.
- Goodell B. (2003). "Brown-rot fungal degradation of wood: Our evolving view." *Wood Deterioration and Preservation: Advances in our changing world* 845:97-118.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., Ebbelwhite, N., Dobson, G. (1999). "Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates." *Soil Biology & Biochemistry* 31(1):145–153.
- Gryndler, M. *et al.* (2004). "Mykorhizní symbióza: o soužití hub s kořeny rostlin." 1. vydání. Praha: *Academia*, ISBN 80-200-1240-0
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). "Trichoderma species–Opportunistic, avirulent plant symbionts." *Nature Rev Microbiol* 2(1):43–56.
- Heath, M. C. (1991). "Evolution of resistance to fungal parasitism in natural ecosystems." *New Phytologist* 119(3):331-343.
- Hibbett, D. S., Gilbert, L. B., Donoghue, M. J. (2000). "Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes." *Nature* 407(6803):506–508.
- Hiltner, L. (1904). "Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründugung und Brache." *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98:59–78.
- Hobbie, E. A. (2006). "Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies." *Ecology* 87(3):563–569.

- Hoffland, E., Kuyper, T. W., Wallander, H. *et al.* (2004). "The role of fungi in weathering." *Frontiers in Ecology and the Environment* 2(5):258–264.
- Högberg, M. N. a Högberg, P. (2002). "Extramatrinal ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil." *New Phytologist* 154(3):791–795.
- Horan, D. P., Chilvers, G. A., Lapeyrie, F. F. (1988). "Time sequence of the infection process eucalypt ectomycorrhizas." *New Phytologist* 109(4):451–458.
- Chalot, M. a Brun, A. (1998). "Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas." *FEMS Microbiology Reviews* 22(1):21–44.
- Chen, D. M., Bastias, B. A., Taylor, A. F. S., Cairney, J. W. G. (2003). "Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*." *New Phytologist* 157(3):547–554.
- Ihrmark, K., Bodeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K. *et al.* (2012). "New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities." *FEMS Microbiology Ecology* 82(3):666–677.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L. *et al.* (2006). "Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny." *Nature* 443(7113):818–822.
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A. J., Schröder, W. H., Godbold, D. L., (2001). "Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*." *New Phytologist* 149(2):327–337.
- Kantor P., Martiník, A., Sedláček, T. (2002). "Douglaska tisolistá na Školním lesním podniku Křtiny." Kostelec nad Černými lesy: *Lesnická práce* 81 (5/02).
- Katoh, K., Asimenos, G., Toh, H. (2009). "Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT." *Bioinformatics for DNA sequence analysis* 537:39–64.
- Katznelson, H. (1946). "The „rhizosphere effect“ of mangels on certain groups of soil microorganisms." *Soil Science* 62(5):343–354.
- Kirk, T. K. a Cullen, D. (1998). "Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper industry." New York: John Wiley & Sons, ISBN 0-471-15770-8.
- Kirk, T. K. a Farrell, R. L. (1987). "Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin." *Annual Review Ecology and Systematics* 41:465–505.
- Klán, J. (1989). "Co víme o houbách." 1. vydání. Praha: SPN, ISBN: 80-04-21143-7.
- Klein, D. A. a Paschke, M. W. (2004). "Filamentous fungi: The indeterminate lifestyle and microbial ecology." *Microbial Ecology* 47(3):224–235.
- Koljalg, U., Larsson, K. H., Abarenkov, K. *et al.* (2005). "UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi." *New Phytologist* 166(3):1063–1068.

- Krause, K. a Kothe, E. (2006). "Use of RNA fingerprinting to identify fungal genes specifically expressed during ectomycorrhizal interaction." *Journal of Basic Microbiology* 46(5):387–399.
- Kremer, B. P. (1995). "Stromy: v Evropě zdomácnělé a zavedené druhy." Praha: *Knižní klub*, ISBN 80-7176-184-2.
- Krupa, S. a Fries, N. (1971). "Studies on ectomycorrhizae of pine. I. Production of volatile organic compounds." *Canadian Journal of Botany* 49(8):1425–1431.
- Lindahl, B. D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S. E., Hogberg, P., Stenlid, J., Finlay, R. D. (2007). "Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest." *New Phytologist* 173(3):611–620.
- Lindahl, B. O., Taylor, A. F. S., Finlay, R. D. (2002). "Defining nutritional constraints on carbon cycling in boreal forests – towards a less 'phytogenic' perspective." *Plant and Soil* 242(1):123–135.
- Luis, P., Kellner, H., Zimdars, B., Langer, U., Martin, F., Buscot, F. (2005). "Patchiness and spatial distribution of laccase genes of ectomycorrhizal, saprotrophic, and unknown basidiomycetes in the upper horizons of a mixed forest cambisol." *Microbial Ecology* 50(4):570–579.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):506–577.
- Marschner, H. (1995). "Mineral Nutrition of Higher Plants." series: Special Publications of the Society for General Microbiology. 2nd edition. London: *Academic Press*, ISBN 10- 1247-354-36.
- Martin, F. (1985). "15-N-NMR studies of nitrogen assimilation and amino acid biosynthesis in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme*." *FEBS Letters* 182(2):350–354.
- Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A., Rio, J. C. (2005). "Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin." *International Microbiology* 8(3):195-204.
- Morgenstern, I., Klopman, S., Hibbett, D. (2008). "Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes." *Journal of Molecular Evolution* 66(3):243–257.
- Mosca, E., Montecchio, L., Scattolin, L., Garbaye, J. (2007). "Enzymatic activities of three ectomycorrhizal types of *Quercus robur* L. in relation to tree decline and thinning." *Soil Biology & Biochemistry* 39(11):2897–2904.
- Mukerji, K. G., Manoharachary, C., Singh, J. (Eds.), (2006). "Microbial Activity in the Rhizosphere." Berlin: *Springer*, ISBN 10 3-540-29182-2.

- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G. (2000). "Soil organic matter mobilization by root exudates." *Chemosphere* 41(5):653–658.
- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S., Dietz, S. (2010). "Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review." *Plant Biology* 12(2):292–301.
- Newsham, K. K., Watkinson, A. R., Fitter, A. H. (1995). "Rhizosphere and root-infecting fungi and the design of ecological field experiments." *Oecologia* 102(2):230–237.
- Niemenmaa, O., Uusi-Rauva, A., Hatakka, A. (2007). "Demethoxylation of [O(14)CH (3)]-labelled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria (Postia) placenta*." *Biodegradation* 19(4):555–565.
- Norkrans, B. (1950). "Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*." *Symbolae Bot Upsalienses* 11:1–126.
- Nygren, C. M. R., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., Taylor, A. F. S. (2007). "Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi." *Mycorrhiza* 17(3):241–248.
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., Vilgalys, R. (2005). "Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples." *Applied and Environmental Microbiology* 71(9):5544–5550.
- Osono, T. a Takeda, H. (2002). "Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan." *Mycologia* 94(3):421–427.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, T., Martínez, J. (2002). "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview." *International Microbiology* 5(2):53–63.
- Perez-Moreno, J. a Read, D. J. (2000). "Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants." *New Phytologist* 145(2):301–309.
- Persson, T. (1980). "Structure and Function of Northern Coniferous Forests: An Ecosystem Study." Sweden: *Swedish Natural Science Research Council (NFR)*, ISBN 91-546-0288-2.
- Pettersson, F. (1994). "Predictive functions for calculating the total response in growth to nitrogen fertilization, duration and distribution over time." Uppsala: *The Forestry Research Institute of Sweden*, ISSN 1103-6648.
- Plett, J. M. a Martin, F. (2011). "Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes." *Trends in Genetics* 27(1):14–22.
- Prescott, C. E. a Grayston, S. J. (2013). "Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs." *Forest Ecology and Management* 309(19-27):19–27.

- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R *et al.* (2012). “A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers.” *BMC Genomics* 13:341–355.
- Rao, M. A., Gianfreda, L., Palmiero, F., Violante, A. (1996). “Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes.” *Soil Science* 161(11): 751–760.
- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B. D., Larsson, K. H., Kuyper, T. W., Taylor, A. F. S., Finlay, R. D. (2003). “Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile.” *New Phytologist* 159(3):775–783.
- Ryan, P. R a Delhaize, E. (2001). “Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots.” *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:527–560.
- Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, Kopecky, J. (2008). “Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics.” *Applied and environmental microbiology* 74(9):2902–2907.
- Selosse, M. A. a Le Tacon, F. (1998). “The land flora: a phototroph–fungus partnership?.” *Trends in Ecology and Evolution* 13(1):15–20.
- Smith, S. E. a Read, D. J. (1997). “Mycorrhizal Symbiosis.” *New Phytologist* 137(3):563–568.
- Steffen, K. T., Cajthaml, T., Šnajdr, J., Baldrian, P. (2007). “Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes.” *Research in Microbiology* 158(5):447–455.
- Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Herinková, J., Cajthaml, T., Baldrian, P. (2008). “Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil.” *Soil Biology & Biochemistry* 40(9):2068–2075.
- Štursová, M., Šnajdr, J., Cajthaml, T., Bárta, J., Šantrůčková, H., Baldrian, P. (2014). “When the forest dies: the response of forest soil fungi to a bark beetle-induced tree dieback.” *The ISME Journal* 8(7): 1–12.
- Talbot, J. M., Allison, S. D., Treseder, K. K. (2008). “Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change.” *Functional Ecology* 22:955–963.
- Taylor, A. F. S., Martin, F., Read, D. J. (2000). “Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) along north-south transects in Europe.” *Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems* 142:343–365.
- Tedersoo, L., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G., Koljalg, U. (2010b). “454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases.” *New Phytologist* 188(1):291–301.

- Tedersoo, L., May, T. W., Smith, M. E. (2010a). "Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages." *Mycorrhiza* 20(4):217–263.
- Tien, M. a Kirk, K. (1983). "Lignin-degrading enzyme from the hymenocete *Phanerochaete chrysosporium*." *Science* 221(4611):661–663.
- Timonin, M. I. (1966). "Rhizosphere effect of healthy and diseased lodgepole pine seedlings." *Canadian Journal of Microbiology* 12(3):531-537.
- Tomme, P., Warren, R. A., Gilkes, N. R. (1995). "Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi." *Advances in microbial physiology* 37:1–81.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itavaara, M. (2000). "Biodegradation of lignin in a compost environment: a review." *Bioresesource Technology* 72(2):169–183.
- Valášková, V., Šnajdr, J., Bittner, B., Cajthaml, T., Merhautová, V., Hofrichter, M., Baldrian, P. (2007). "Production of lignocellulosedegrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest." *Soil Biology & Biochemistry* 39(10):2651-2660.
- van der Wal, A., Bloem, J., Mulder, C., de Boer, W. (2009). "Relative abundance and activity of melanized hyphae in different soil ecosystems." *Soil Biology & Biochemistry* 41(2):417–419.
- Větrovský, T., a P. Baldrian (2013). "Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED." *Biology and Fertility of Soils* 49(8):1027-1037.
- Voříšková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T., Baldrian P. (2014). "Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil." *New Phytologist* 201(1):269–278.
- Votrubová, O. (2001). "Anatomie rostlin." Praha: *Karolinum*, ISBN 80-246-0367-5.
- Wallander, H. (2006). "External mycorrhizal mycelia – the importance of quantification in natural ecosystems." *New Phytologist* 171(2):240–242.
- Wallander, H., Nilsson, L. O., Hagerberg, D., Bååth, E. (2001). "Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field." *New Phytologist* 151(3):753–760.
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., Thomashow, L. S. (2002). "Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens." *Annual Reveiw of Phytopathology* 40:309–348.
- Whipps, J. M. (2001). "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere." *Journal of Experimental Botany* 52:487–511.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics; PCR protocols, a guide to methods and applications." Waltham, Massachusetts: *Academic Press*, ISBN 978-0123721815

- Winkel-Shirley, B. (2001). "Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology." *Plant Physiology* 126(2):485–493.
- Withers, S. G. (2001). "Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses." *Carbohydrate Polymers*. 44(4):325–337.
- Worrall, J. J., Anagnost, S. E., Zabel, R. D. (1997). "Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi." *Mycologia* 89(2):199–219.
- Zeller, B., Brechet C., Maurice J. P., Le Tacon, F. (2007). "13C and 15N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and Norway spruce plantation." *Annals of Forest Science* 64(4):419–429.
- Žifčáková, L., Dobiášová, P., Kolářová, Z., Koukol, O., Baldrian, P. (2011). "Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles." *Fungal ecology* 4(6):427–436.

Příloha

Tabulka 9. Enzymatická aktivita u lyofilizovaných vzorků - 1. pokus. Tučné datum odběru VII/2013 je 1 měsíc po ukončení toku asimilátů.

vzorek	enzymatická aktivita (mU/g)						enzymatická aktivita (nM min ⁻¹ x ml ⁻¹)									
	Cel	Xyl	Lac	MnP	G	C	X	N	U	P	Y	αG				
Kofen	IV/2013	38,72	39,04	1,18	0,00	9394	4501	2478	5540	1870	104319	155367	4908			
	V/2013	37,88	38,43	1,02	1,50	12112	3158	2394	8290	1333	115638	143215	4457			
	VII/2013	24,06	24,24	11,96	0,69	22878	5079	5174	10548	773	251949	319156	8969			
	VIII/2013	21,25	52,96	3,57	0,15	20075	8896	3549	5884	2844	122321	152571	4164			
	XI/2013	29,78	140,36	20,01	0,00	46152	17963	9522	8994	2711	120892	221128	6537			
	XII/2014	75,96	103,25	40,93	26,01	75110	19843	11429	11526	3963	200584	327902	9735			
	VII/2014	93,47	43,13	58,10	28,38	29523	3449	2350	2389	240	140805	337667	1417			
Rhizosfera	IV/2013	5,40	4,55	5,16	0,00	11004	3091	6105	2338	234	61357	126941,39	1262,24			
	V/2013	4,36	5,10	6,74	0,59	9270	3277	6034	3024	121	54998	119850,18	844,04			
	VII/2013	3,64	3,16	5,28	0,00	8175	2992	5612	2551	203	46177	116027,13	949,1			
	VIII/2013	3,17	6,54	1,94	0,00	5681	1129	3478	1743	80	31391	87591,827	541,48			
	XI/2013	0,00	0,47	0,98	0,00	6983	1704	5624	1259	0	38586	96750,82	392,78			
	XII/2014	3,80	0,00	0,68	0,00	4183	1242	3030	992	170	29864	68597	665,36			
	VII/2014	3,76	1,11	0,97	0,55	4321	1518	3749	1331	200	31456	73848	739,92			
Bulk soil	IV/2013	1,83	4,34	1,17	0,00	5254	1120	3260	1204	143	27748	78541	621,31			
	V/2013	1,01	3,58	0,43	0,74	3170	905	2247	1134	105	24382	69317	383,19			
	VII/2013	2,51	3,51	0,26	0,00	4399	1488	3068	887	131	25457	72936	652,82			
	VIII/2013	0,09	3,44	0,27	1,38	3701	732	2487	1040	141	22941	69600	277,63			
	XI/2013	1,39	1,53	0,33	0,72	3717	822	2978	834	22	22959	73997	257,70			
	XII/2014	4,14	0,00	0,45	0,91	4602	1320	2602	1114	165	24269	59204	620,97			
	VII/2014	3,90	1,36	0,26	0,70	2019	590	2092	526	62	22382	57739	307,57			

Značení enzymů: Cel – celulóza, Xyl – xylanáza, Lac – lakáza, MnP – mangan peroxidáza, G-β-glukosidáza, C – celobiolihydroláza, X – β-xylosidáza, N – chitináza, U – β-glukuronidáza, P-fosfatáza, Y – lipáza, αG – α-glukosidáza.

Tabulka 10: Směrodatná odchylka pro enzymatickou aktivitu lyofilizovaných vzorků.

vzorek	směrodatná odchylka												
	CEL	XYL	MNP	LACE	MUFG	MUFC	MUFX	MUFN	MUFU	MUFP	MUFY	MUFdG	
IV/2013	7,69	11,05	0,00	1,35	3441,73	8567,56	2504,21	3197,69	1868,69	11616,84	33191,13	2535,60	
V/2013	17,26	35,39	0,00	1,14	3979,46	2159,54	1423,37	3117,84	1115,14	19852,00	31557,09	912,86	
VII/2013	14,44	22,37	0,00	14,31	17913,13	4382,00	2661,63	4681,88	631,74	183733,59	219188,15	9988,34	
VIII/2013	15,63	23,79	0,00	4,36	21003,74	17774,19	2959,55	3045,62	3617,07	26777,12	48930,02	850,34	
XI/2013	8,98	31,03	0,00	23,57	12444,70	7622,59	2808,18	2975,15	1848,60	22222,29	32703,34	1801,54	
XII/2014	31,08	40,94	26,01	56,22	27379,06	9405,31	2850,90	3200,30	4583,12	28217,77	89053,81	2988,17	
VII/2014	42,48	30,81	28,38	75,91	10346,79	3693	1691,46	2415	422,38	37818	156280,32	1280,32	
IV/2013	1,67	2,91	0,00	3,29	3670,62	881,14	1856,11	1046,83	351,64	19527,17	30055,26	373,78	
V/2013	1,31	5,41	0,00	4,53	3997,51	1511,41	2100,42	1082,67	185,32	15355,85	30235,26	606,68	
VII/2013	1,74	4,04	0,00	3,10	4117,78	1934,15	2957,98	1279,57	313,27	16699,62	33749,72	925,37	
VIII/2013	1,05	5,59	0,00	1,86	3472,54	592,10	2080,97	763,18	107,15	17295,13	38684,14	477,00	
XI/2013	0,00	0,47	0,00	1,43	4363,95	1759,52	4688,43	1283,14	0,00	20461,15	43437,51	654,28	
XII/2014	1,14	0,00	0,00	0,52	2954,33	1270,68	1666,47	795,33	193,91	18948,73	28811,41	840,35	
VII/2014	2,90	0,69	0,55	1,25	3793,48	1177,09	2833,55	1459,11	314,82	15726,06	36193,27	753,10	
IV/2013	0,62	0,94	0,00	0,70	1903,10	596,03	719,50	263,22	108,21	7384,80	13133,92	280,97	
V/2013	1,56	2,36	0,00	0,22	1517,27	319,85	783,57	310,94	108,22	7429,59	11754,97	224,73	
VII/2013	5,28	2,85	0,00	0,29	2286,57	900,29	1697,34	322,22	137,32	9757,44	23058,83	458,42	
VIII/2013	0,26	1,25	0,00	0,26	2834,45	491,52	1607,72	824,32	198,26	13010,89	38613,72	267,73	
XI/2013	2,74	0,91	0,00	0,43	2056,51	495,65	1287,25	705,80	45,03	10576,48	18127,28	293,87	
XII/2014	1,32	0,00	0,91	0,36	3146,81	483,47	1278,15	893,56	89,20	10403,16	17718,56	303,78	
VII/2014	1,42	0,90	0,70	0,11	1074,09	413,40	843,40	314,65	75,14	5413,97	18241,39	239,51	

Značení enzymů: Cel – celulóza, Xyl – xylanáza, Lac – lakáza, MnP – mangan peroxidáza, G-β-glukosidáza, C – celobiolhydroláza, X – β-xylosidáza, N – chitináza, U – β-glukuronidáza, P-fosfatáza, Y – lipáza, αG – α-glukosidáza

Tabulka 11: Enzymatická aktivita u 18 OTU - pokus 2. Naměřené hodnoty enzymatické aktivity u hub narostlých z kořenů na mediu MERBS, které byly dále přeočkovány do tekutého média. Jedná se o průměrné hodnoty pro jednotlivé operační taxonomické jednotky.

OTU	enzymatická aktivita (nM min ⁻¹ x ml ⁻¹)											enzymatická aktivita (mU/ml)		
	G	αG	C	X	N	S	P	PP	Lakáza	Endoceluláza	Endoxylanáza			
CL000	680,20	106,07	444,87	263,55	285,27	0,38	801,13	67,09	0,06	1,56	11,02			
CL001	451,48	173,90	235,60	168,74	121,18	0,71	867,53	31,78	0,44	0,91	11,49			
CL002	656,56	217,51	397,11	391,02	168,25	0,00	816,18	34,67	0,10	3,32	20,42			
CL003	570,76	634,11	666,37	256,18	287,00	23,58	914,76	136,82	0,04	0,30	1,49			
CL004	70,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1146,29	36,45	0,00	0,50	0,51			
CL005	371,53	512,60	183,67	62,69	27,24	3,70	698,64	144,38	0,01	0,42	4,63			
CL006	196,74	1,93	33,62	5,89	111,18	0,00	449,22	28,35	0,00	1,64	1,16			
CL007	942,29	78,44	727,23	90,90	97,20	1,81	1151,73	91,38	0,00	5,87	6,31			
CL008	1192,80	78,95	1211,73	429,24	341,46	0,00	617,47	65,52	0,03	1,86	21,97			
CL009	1121,03	474,41	1011,84	269,49	319,26	2,73	829,26	55,37	0,07	1,62	24,51			
CL010	1152,05	1169,86	1299,99	457,74	473,79	28,05	1055,83	269,97	0,01	0,55	1,48			
CL014	1161,53	35,95	1231,20	1539,98	199,10	6,60	76,40	8,23	0,06	1,02	17,37			
CL015	307,77	27,04	93,56	6,03	95,13	0,78	651,48	20,88	0,69	1,71	1,75			
CL016	1231,81	44,38	1230,31	254,99	176,55	0,00	487,65	73,61	0,01	1,16	40,22			
CL017	1062,11	7,23	712,65	158,02	21,54	0,00	183,61	39,08	0,01	0,52	33,96			
CL018	806,56	2,94	317,22	51,20	267,26	0,00	504,15	50,75	0,06	1,64	10,35			

Značení enzymů: Cel – celulóza, Xyl – xylanáza, Lac – lakáza, MnP – mangan peroxidáza, G-β-glukosidáza, C – celobiohydroláza, X – β-xylosidáza, N – chitináza, U – β-glukuronidáza, P-fosfatáza, Y – lipáza, αG – α-glukosidáza

Tabulka 12. Směrodatná odchylna enzymatické aktivity u OTU, které se podařilo vykultivovat a více než jedenkrát.

OTU	G	směrodatná odchylna									
		MUFaG	MUF C	MUF X	MUF N	MUF S	MUF P	MUF PP	Lakáza	Endoceluláza	Endoxylanáza
CL000	355,54	132,28	395,37	244,37	174,96	0,49	419,84	33,17	0,10	0,80	9,59
CL001	458,00	282,99	386,19	165,84	160,77	1,33	301,47	11,55	0,96	0,37	9,96
CL002	354,56	345,35	331,25	607,36	197,68	0,00	322,06	16,37	0,20	2,92	14,52
CL003	696,73	774,24	927,70	347,80	343,14	33,34	146,43	155,18	0,00	0,30	0,38
CL004	92,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	180,62	36,24	0,00	0,34	0,06
CL005	510,53	647,18	259,75	88,65	38,52	5,24	238,26	176,51	0,01	0,01	2,56
CL006	164,24	2,73	42,79	8,32	24,61	0,00	192,01	0,69	0,00	0,87	0,18
CL007	350,36	76,70	823,30	121,23	9,80	2,37	344,00	101,35	0,00	4,61	5,93
CL008	37,31	75,58	15,59	336,33	77,26	0,00	53,41	22,36	0,01	0,11	4,02
CL009	135,90	638,20	478,98	252,70	254,91	3,86	699,68	3,68	0,02	0,12	6,53

Tabulka 13: Enzymatická aktivity dvou vybraných nejbohatších OTU a jejich porovnání s aktivitou jeden a půl roku po pokácení (listopad 2013 a březen 2014).

OTU	odběr	enzymatická aktivity (nM min ⁻¹ x ml ⁻¹)											
		MUF G	st. odch.	MUFaG	st. odch.	MUF C	st. odch.	MUF X	st. odch.	MUF N	st. odch.	MUF S	st. odch.
CL000	1	680,20	363,55	21,89	29,64	240,78	285,80	263,55	87,34	157,85	150,34	0,38	0,54
	2	838,25	179,44	169,21	127,62	597,94	344,30	385,96	221,11	380,84	87,49	0,19	0,25
CL001	1	451,48	409,64	52,19	45,98	68,15	48,25	144,86	132,06	121,18	143,80	0,71	1,19
	2	722,39	509,62	356,47	318,50	486,78	435,49	204,56	163,43	251,51	150,55	1,59	1,49
		enzymatická aktivity (mU/ml)											
		enzymatická aktivity (nM min ⁻¹ x ml ⁻¹)											
OTU	odběr	MUF P	st. odch.	MUF PP	st. odch.	Lakáza	st. odch.	Endoceluláza	st. odch.	Endoxylanáza	st. odch.		
CL000	1	415,91	235,79	67,09	35,63	0,01	0,01	1,77	0,78	7,16	4,28		
	2	1090,05	167,14	64,14	26,03	0,10	0,11	1,40	0,77	13,91	11,31		
CL001	1	867,53	269,64	31,78	10,33	0,72	1,01	0,92	0,46	11,33	8,82		
	2	959,72	0,70	35,40	13,10	0,01	0,01	0,89	0,14	11,73	11,47		

Tabulka 14: Dekompozice kořenů

	odběr	lyofilizované kořeny (g/m ² půdy)	průměr IV a V (100%)	pokles z původních 100% na	rychlost rozkladu (%)
před pokácením	IV/2013	96,2	82,7	-	-
	V/2013	69,1	-	-	-
po pokácení	VII/2013	41,4	-	50%	50%
	VIII/2013	52,4	-	63%	37%
	XI/2013	65,1	-	79%	21%
	XII/2013	55,5	-	67%	33%
	VII/2014	32,7	-	39%	61%