

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Jitka Krejčíková

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vývoj společenstva ektomykorhizních hub na 4 trvalých plochách
horských smrčín NP a CHKO Šumava narušených disturbancemi

Diplomová práce

Jitka Krejčíková

Školitel: Mgr. Michal Choma

Konzultantky: Mgr. Martina Vašutová, Ph. D.

prof. Ing. Hana Šantrůčková, CSc

České Budějovice 2019

Krejčíková J. (2019) Vývoj společenstva ektomykorhizních hub na 4 trvalých plochách horských smrčín NP a CHKO Šumava narušených disturbancemi [Development of ectomycorrhizal fungal communities at 4 plots in the disturbed mountain spruce forests in the National Park and Protected Landscape Area Šumava, Mgr. Thesis, in Czech.] 47 pp, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this thesis is to describe the development of ectomycorrhizal fungal communities at 4 study plots in mountain spruce forests after different level of disturbances by bark beetle and windstorms. In order to achieve this aim, all the plots were monitored for sporocarps of ectomycorrhizal fungi for 9 years (2007 – 2014 and 2018) and this data was complemented by environmental factors from the years between 2007 and 2014. Subsequently, the data from monitoring of sporocarps were compared with ectomycorrhizal fungal DNA sequences obtained from one-off sampling of soil in 2018. A possible effect of vegetation on ectomycorrhizal fungal community detected by DNA sequences was also tested.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Tuto práci bych nikdy nebyla schopná vypracovat bez (nejen) odborné pomoci velkého množství lidí, kterým bych tímto chtěla co nejsrdečněji poděkovat. Jedná se zejména o vedoucí mé práce, jejichž pomoc po stránce odborné i lidské mnohonásobně přesahovala to, co by jim ukládaly “povinnosti vedoucích diplomové práce“, a já si toho nesmírně vážím. Mé poděkování patří rovněž všem, kteří mi poskytli data, která jsou zpracována v této práci. Děkuji všem, kteří mi pomáhali v terénu se sběrem dat, v laboratoři se zpracováním vzorků či se statistickým zpracováním výsledků. Mé poděkování patří i všem vyučujícím, s kterými jsem měla tu čest se během svého studia na PŘF JU setkat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za vše, co pro mne dělají.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CJD – plocha pojmenovaná Čertovo jezero dolní

CJH – plocha pojmenovaná Čertovo jezero horní

ECM – ektomykorhizní

CHKO – chráněná krajinná oblast

NP – národní park

NPR – národní přírodní rezervace

PJJ – plocha pojmenovaná Plešné jezero u jezera

PJP – plocha pojmenovaná Plešné jezero u památníku

OBSAH

Úvod.....	1
1. Literární rešerše.....	2
I. Šumavské smrčiny	2
i. Přirozené smrčiny v České republice a na Šumavě	2
ii. Bezzásahovost v šumavských smrčínách.....	3
iii. Ekologické disturbance v horských smrčínách.....	4
iv. Disturbance kůrovcem	4
v. Větrné disturbance	6
II. Ektomykorhizní houby	7
i. Mykorhizní symbióza	7
ii. Ektomykorhizní symbióza	7
iii. Uhlík, který ECM houby využívají.....	9
iv. Tvorba plodnic u ECM hub	10
v. Ektomykorhizní houby a disturbance.....	10
2. Cíle a hypotézy.....	14
3. Materiály a metody	15
I. Lokality	15
i. Plochy u Plešného jezera.....	15
ii. Plochy u Čertova jezera	15
II. Uspořádání trvalých ploch.....	16
III. Metody	17
4. Výsledky	19
I. Plodnice.....	19
i. Druhové složení a společné znaky všech ploch	19
ii. Vývoj společenstva hub na jednotlivých plochách	23
iii. Výskyt plodnic hub a faktory prostředí	29
II. Sekvence ECM hub v půdě.....	29
III. Vliv vegetace na výskyt DNA ECM hub	31
5. Diskuze.....	34
I. Plodnice.....	34
II. Sekvence ECM hub v půdě.....	38
III. Vliv vegetace na výskyt DNA ECM hub	39
6. Závěr	40

ÚVOD

Působení kůrovce je spolu s vichřicemi považováno za významný přirozený faktor ovlivňující dynamiku a vývoj horských smrčín. Tyto disturbance, které často způsobují plošné odumření stromového patra, uvolňují prostor a zdroje živin pro růst nových stromů, a tím dochází k přirozenému zmlazení porostu. Na nějaký čas po disturbanci se ale mění celkové fungování daného ekosystému a mimo jiné jsou ovlivněny i organismy vytvářející se stromy symbiotické vztahy. Mezi tyto organismy patří i ektomykorhizní houby, které vytvářejí na povrchu kořínků stromů hyfový plášť a pronikají do mezibuněčných prostor, kde vytvářejí tzv. Hartigovu síť. V tomto útvaru označovaném jako ektomykorhiza houby výměnou za rostlinné asimiláty dodávají symbiotickým partnerům důležité živiny (dusík, fosfor, hořčík aj.). Dle dosavadních poznatků jsou ektomykorhizní houby na této symbióze životně závislé, jelikož rostlinné asimiláty jsou jejich buď jediným, či velmi podstatným zdrojem uhlíku. Pokud tedy dojde k disturbanci způsobující plošné odumření stromového patra tedy, ektomykorhizní houby mají dočasně značně omezený zdroj uhlíku, a proto se pravděpodobně zásadně změní ve struktura společenstva ektomykorhizních hub.

Cílem této práce je popis vývoje společenstva ektomykorhizních hub na 4 trvalých plochách v NP a CHKO Šumava různou měrou poškozených disturbancemi. K tomuto účelu byla zpracována data z dlouhodobého monitoringu plodnic z let 2007 - 2014 a 2018, doplněného daty o faktorech prostředí (teplota, srážky, půdní chemismus) z let 2007 – 2014. Dále pak byla data o plodnicích porovnána s daty získanými z jednorázového sekvenování DNA ektomykorhizních hub z půdy odebrané v roce 2018 a tyto sekvence byly rovněž vztaženy k vegetačním snímkům z odběrových míst.

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE

I. ŠUMAVSKÉ SMRČINY

i. Přirozené smrčiny v České republice a na Šumavě

Přirozené smrčiny jsou typem lesa, v němž dominantní, až 100 % zastoupenou dřevinou, je smrk ztepilý (*Picea abies*). Zastoupeny mohou v menší míře být i další druhy listnatých stromů, zejména jeřáb ptačí (*Sorbus aucuparia*), bříza bělokorá (*Betula pendula*), bříza pýřitá (*Betula pubescens*), javor klen (*Acer pseudoplatanus*) či buk lesní (*Fagus sylvatica*). Na rozdíl od hospodářských smrkových kultur je výskyt přirozených smrčín v ČR omezen převážně na polohy submontánního stupně, tedy zhruba od 950/1 100 m. n. m. do 1 350 m. n. m. V nižších polohách se smrčiny nacházejí pouze na místech se specifickými abiotickými faktory prostředí (podmáčené, oglejené, či zrašelinělé půdy, skalní výchozy, vrcholky kopců). Přirozené smrčiny se dle nadmořské výšky a míry zamokření půdy, které se odrážejí ve složení bylinného patra, dělí do tří kategorií: horské třtinové smrčiny, rašelinné a podmáčené smrčiny a horské papratkové smrčiny (Chytrý, 2010).

Na Šumavě se vyskytují všechny tři typy přirozených smrčín, přičemž smrčiny submontánního stupně začínají zhruba od 1 200 m. n. m. Vzhledem k tomu, že právě na Šumavě byly zachovány jedny z nejrozsáhlejších ploch přirozených nebo přírodě blízkých smrčín v rámci České republiky, jsou také i jedním z hlavních předmětů ochrany přírody v rámci NP a CHKO Šumava. Šumavské smrčiny jsou ale zároveň i předmětem mnoha společenských sporů, ať už se jedná o míru jejich původnosti a ovlivnění člověkem v minulosti, tak o způsob jejich managementu a ochrany v přítomnosti a budoucnosti. Tyto otázky a debaty se do určité míry vyostřily zvláště v obdobích silného působení vichřic, které vyvrcholily v roce 2007 orkánem Kyrill, a gradacemi působení lýkožrouta smrkového mezi lety 1984-1989, 1995-1999 a 2007-2012, kdy na velkých plochách došlo k rozpadu stromového patra (Zahradník, 2015). Nejen na základě těchto sporů začalo probíhat velké množství studií a průzkumů, jejichž cílem bylo poskytnout objektivní data a podklady do mnohdy spíše emotivních a nezřídka politicky motivovaných diskuzí (Kjučkov et al., 2019; Šantrůčková, Vrba, 2010; Chalupa, Loužek, 2011).

ii. Bezzásahovost v šumavských smrčinách

Z dosavadních analýz vyplývá, že ač v některých oblastech Šumavy byly smrčiny významnou měrou ovlivněny hospodařením člověka, stále existují porosty, kde mnohé nasvědčuje spíše tomu, že vliv lidské činnosti byl minimální nebo téměř žádný (Svoboda et al., 2010; Čada et al., 2016). Tyto nejcennější oblasti jsou dle nového, v roce 2019 schváleného plánu péče zařazeny do 1. zón NP Šumava, kde je uplatňován přírodě blízký, tedy bezzásahový management (Hubený, 2019). Vyloučení zásahů člověka z přírodě blízkých ekosystémů není bezúčelné a zpátečnické jednání, které by označovalo veškeré lidské zásahy v přírodě za špatné a které by chtělo bránit ekonomickému rozvoji. Naopak, bezzásahový režim ve vybraných lokalitách umožňuje člověku pozorovat přírodní děje a získané poznatky o jejich fungování využít v hospodářské krajině (Niemelä, 1999). Zároveň takováto místa přispívají k územnímu systému ekologické stability (ÚSES), tedy k udržení přírodní rovnováhy a příhodného životního prostředí i pro člověka.

Bezzásahový management v 1. zónách NP Šumava byl a je předmětem diskuzí napříč odbornou a politickou veřejností. Jeho fungování v daném typu ekosystému ale bylo již ověřeno zkušenostmi ze sousedního NP Bavorský les v Německu (Heurich, 2009) a podpořeno řadou výzkumů srovnávající zásahový a bezzásahový režim nejen na Šumavě (Jonášová et al., 2010; Jonášová, Prach, 2004, Svoboda, 2012). I vzhledem k tomu, že se v 1. zónách NP Šumava podařilo zachovat myšlenku bezzásahovému režimu, s odstupem času od disturbancí mohou podporu podloženou objektivními daty doložit i práce monitorující přímo 1. zóny NP Šumava (Čížková et al., 2011; Matějka, 2018).

Větrné a kůrovcové disturbance, jak bude podrobněji popsáno později, značně ovlivňují jednotlivé organismy a dochází k výrazným změnám v celkovém fungování ekosystému.

Při ponechání zasažených lokalit přirozenému vývoji ale bývají zachovány některé významné environmentální podmínky, které by byly zásahem člověka narušené. Jedním příkladem může být např. teplota půdního povrchu. Dalo by se předpokládat, že po odumření stromového patra bude docházet k většímu oslunění, a tedy zahřívání půdního povrchu. Dlouhodobé měření však ukázalo, že při přirozené obnově lesa bez mechanického narušení půdních horizontů těžkou mechanikou a při ponechání stojících souší a ležícího dřeva jsou teplotní poměry povrchu půdy pouze mírně zvýšené a bližší teplotním poměrům neporušeného lesa, než jsou místa narušená těžbou (Hais, Kučera, 2008; Šantrůčková, Vrba, 2010). Oproti tomu při těžbě dřeva mnohdy dochází k utužení půdy pojezdem těžké mechaniky. Utužení zásadně mění fyzikálně-chemické

vlastnosti půdy jako jsou např. porozita, aerace, schopnost infiltrace vody či teplota, a bylo dokázáno, že při tomto stavu dochází v půdě k nárůstu počtu druhů saprofytických a parazitických hub, ale k úbytku ektomykorhizních hub, které, jak bude doplněno později, dodávají stromům důležité živiny. Zachování dobrého stavu půdy má proto zásadní význam pro celkovou regeneraci ekosystému (Hartmann et al., 2014). Je ale potřeba zdůraznit, že i přirozené disturbance mohou způsobit mechanické porušení půdních horizontů (např. vznik vývrátů při vichřicích), což v daných ekosystémech ovlivňuje vývoj půdy (Šamonil et al., 2010).

iii. Ekologické disturbance v šumavských horských smrčínách

Ekologická disturbance je definována jako síla nebo událost, která způsobuje odumření organismů, a mění tak jejich prostorové uspořádání v ekosystému, který obývají (Paine, 2019), případně jako jakýkoliv vliv, který zvyšuje pravděpodobnost odumření organismu (Dickinson, Murphy, 2007). V současnosti jsou ekologické disturbance vnímány jako přirozená součást vývoje přírodě blízkých ekosystémů, která určuje jejich dynamiku a umožňuje přirozenou obnovu (Nováková, Edwards-Jonášová, 2015; Janda et al., 2017). U středoevropských horských smrčín včetně Šumavy jsou tyto disturbance způsobeny zejména gradacemi kůrovce a vichřicemi. Oba disturbanční činitelé jsou příčinou narušení a odumření části stromového patra. Míra narušení závisí na síle disturbance a z historických záznamů a dendrochronologických měření vyplývá, že se může jednat o častější bodové maloplošné i méně časté, ale relativně pravidelně se opakující, velkoplošné narušení (Čada et al., 2013).

iv. Disturbance kůrovcem

Kůrovci jsou podčeleď brouků vázaných na lýko či dřevo stromů. V případě kůrovců, jejichž živnou rostlinou je smrk ztepilý (*Picea abies*), se v ČR můžeme setkat s více než 30 druhy. Nejčastější je lýkožrout smrkový (*Ips typographus*), ale běžně se u nás vyskytují i příbuzné druhy, např. lýkožrout menší (*Ips aminitus*), lýkožrout lesklý (*Pityogenes chalcographus*), lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) aj. Životní cyklus lýkožrouta smrkového začíná na jaře, kdy nejprve samečci po opuštění zimoviště vykusují snubní komůrky ve stromě, kde chtějí založit novou generaci. Zároveň produkují feromon lákající jak samičky, tak další samečky. Oplodněné samičky vykusují na snubní komůrku navazující vertikální matečné chodbičky, po jejichž stranách kladou vajíčka (cca 1 – 2 denně, v celkovém počtu asi 30 – 60 na samici). Z vajíček se líhnou larvy, které

mají 3 stádia (tzv. instary) a vykusují horizontální chodbičky na jejichž konci larva třetího instaru vytvoří tzv. kukelní komůrku, kde dochází k metamorfóze v dospělce. Mladí dospělci potřebují po metamorfóze rozvinout zejména létací svaly a dokončit dozrání pohlavní soustavy, a proto ihned přijímají potravu. Toto období, dlouhé zhruba 10 – 14 dní, je proto označováno jako tzv. úživný žír. Následně brouci vyletují a zakládají další generaci. Celkový počet generací se obvykle pohybuje mezi 1 – 2, a to v závislosti na podmínkách prostředí, ale v posledních letech dochází k vytvoření až 3 generací (Šantrůčková, Vrba, 2010; Hlásny et al., 2011)

Pro výše zmíněné druhy kůrovců je hlavní živnou rostlinou v Evropě právě smrk ztepilý (*Picea abies*), a tudíž přirozené smrčiny byly zřejmě jejich hlavním, a vlastně původním biotopem výskytu. Vztah kůrovec-smrk je zároveň mnohem komplexnější a je na něj vázána řada dalších organismů – kůrovec je významný zdroj potravy například pro zákonem chráněného datlíka tříprstého (*Picoides tridactylus*) a existuje i několik přirozených parazitů a parazitoidů kůrovce. Naproti tomu kůrovec na sebe váže např. kůru napadající houbu rodu *Ceratocystis*, která brání vytváření ochranného pletiva (kalusu) (Šantrůčková, Vrba, 2010; Baier et al, 2002).

Při napadení kůrovcem se zdravé stromy brání produkcí pryskyřice a dalších pro kůrovce jedovatých látek (fenoly, terpeny). Pokud je tato produkce dostatečná, zalévá pryskyřice prostor kůrovcem vytvořených chodbiček i brouky samotné. Odumření nastává především u oslabených stromů, u nichž je produkce pryskyřice z nějakého důvodu omezená a které kůrovec pomocí specifických pachových stop vyhledává přednostně (Erbilgin et al., 2006).

Jednou z přirozených příčin oslabení stromu může být jeho stáří. Pokud zahrneme i člověkem vytvořené smrkové kultury, nejčastěji bývají napadeny porosty starší než 60 let (Kula, 2014). Při zjišťování věkové struktury v horských smrčinách na Šumavě provedeného mezi lety 2003 – 2010 bylo zjištěno, že největší podíl z celkového počtu pozorovaných stromů se pohybuje okolo průměrného věku 98 let. Nacházely se ale i starší stromy, které kůrovci podlehlly až ve věku zhruba 200 až 300 let, a ty z nejstarších, ale zároveň nejméně četných, byly přes 500 let staré (Hubený, Čížková, 2010). Vůbec nejstarší známý strom ze Šumavy podlehl až ve staří 632 let (Hubený, 2019b). Oslabení může také nastat při nevhodných podmínkách prostředí a příčina může být přirozená, antropogenní, i kombinace obojího (sucho; nadměrné oslunění v rozvolněném porostu po vichřici; kyselá deště; patogenní houby, které kůrovec zanášá do svých chodbiček aj.). Při kůrovcové gradaci, tedy přemnožení kůrovce nad obvyklou míru, napadá kůrovec ale i zdravé stromy. Při napadení neobvykle velkým množstvím brouků přirozené obranné mechanismy jinak

zdravého stromu nemusí fungovat dostatečně a dochází k jeho uschnutí (Šantrůčková, Vrba, 2010; Baier et al., 2002). Není úplně jasné, co je důvodem vzniku kůrovcových gradací, ale bylo zjištěno, že příčiny nelze hledat pouze na lokální úrovni v místě jejich vzniku, ale je třeba zohledňovat faktory působící ve velkém měřítku (až desítky tisíc km²), případně i v měřítku globálním (změny klimatu). Jedním z takových důvodů může být faktor sucha, který významně přispívá ke vzniku kůrovcových gradací. Zohledňování faktorů působících ve velkém měřítku proto do určité míry vyvrací tvrzení, že bezzásahové zóny národních parků zasažené kůrovcem jsou zdrojem šíření kůrovce do celého regionu, ale naopak podporuje předpoklad, že faktor působící v regionálním měřítku způsobil kůrovcovou gradaci i v bezzásahových zónách (Seidl et al., 2016).

v. Větrné disturbance

Gradace kůrovce jsou často spojeny s působením vichřic, kdy dochází k jeho velkému namnožení na vzniklých polomech. Vichřice jsou v horských oblastech častější než v oblastech nížin, a proto také v dynamice horských lesů hrají významnou roli. Působení větru jako disturbančního činitele v ekosystémech je typické střídáním častějších a méně rozsáhlých disturbancí, kdy dochází pouze k bodovému, nebo maloplošnému narušení, s méně častými, ale rozsáhlými disturbancemi, které v případě horských smrčín mohou vést k narušení až desítek hektarů stromového patra. Střídání disturbancí různých intenzit je důležitým faktorem, který v prostředí přírodě ponechaných horských smrčín umožňuje vytvoření věkové a prostorové heterogenity porostu. To, jakým způsobem bude vítr na daný ekosystém působit, je ovlivněno kombinací několika podmínek – zejména rychlostí, směrem a silou větru v nárazech, topografií terénu, a stářím a strukturou porostu. Přírodě blízké lesní ekosystémy ve střední Evropě mají různou časovou dynamiku větrných disturbancí. V horských smrčínách se vítr, který je schopný způsobit maloplošné disturbance, objevuje každoročně. Frekvence vichřic, které způsobují velkoplošné disturbance smrčín, se dle historických podkladů objevuje řádově jedenkrát za století (Janda et al., 2014).

II. EKTOMYKORHIZNÍ HOUBY

i. Mykorhizní symbióza

Mykorhizní symbióza je dle práce Smith a Read (2008) definována jako mutualistický vztah mezi rostlinou a houbovým organismem, který za určitých podmínek oběma partnerům může přinášet výhody v jejich samostatném životním fungování, ačkoliv za jiných environmentálních podmínek se může stát spíše nevýhodným, až parazitickým, tedy výhodným pouze pro jednoho partnera na úkor druhého. Obecně se rozlišují 4 základní typy mykorhizních symbióz (arbuskulární, ektomykorhizní, erikoidní a orchideoidní) s různou mírou specifčnosti partnerů. Existují předpoklady, že mykorhizní vztah (arbuskulární mykorhiza) hrál významnou roli v období siluru (před 443 – 416 milióny let) při přechodu rostlin z vody na souš, kdy zřejmě umožnil rostlinám lépe snášet nepříznivé podmínky suchozemského prostředí (Courty et al., 2010). První z doložených pozorování mykorhizní symbiózy je z roku 1840 rakouským botanikem, paleontologem a rostlinným fyziologem F. Ungerem. Podrobný popis a termín mykorhiza byl ale poprvé použit v roce 1885 německým botanikem a mykologem A. B. Frankem a označoval samotný útvar, který rostlina a houba společně vytvořily. V současnosti je tento termín používán volněji a označuje jak zmiňovaný útvar, tak obecně nahrazuje termín mykorhizní symbióza a je tedy vnímán jako označení daného vztahu (Marks, Kozlovski, 1973; Smith, Read, 2008).

ii. Ektomykorhizní symbióza

Ektomykorhizní symbióza je vztah mezi houbami převážně ze skupin Basidiomycota a Ascomycota a vyššími rostlinami, zejména dřevinami – nahosemennými i krytosemennými. Zjednodušeně rostlina poskytuje houbovému organismu, se kterým je v kontaktu prostřednictvím speciálních útvarů – ektomykorhiz, asimiláty výměnou za minerální živiny, vodu a částečnou ochranu kořínků před patogeny. Ektomykorhizní vztah je však ve skutečnosti mnohem komplexnější, a kromě složitějšího principu fungování mezi hlavními symbionty (ECM houba – dřevina) je již také známo, že významnou součástí tohoto vztahu jsou i další organismy (bakterie, jiné houby) žijící v blízkosti kořínků, v tzv. rhizosféře (Schrey et al., 2005).

Z řečtiny pocházející termín ektomykorhizní doslova popisuje vzhled tohoto vztahu, tedy že na povrchu (ekto-) kořene (-rhiza) je houba (-myko-). Houbové hyfy na povrchu kořínku rostliny

vytvářejí tzv. hyfový plášť, z něhož pouze mezibuněčnými prostory pronikají pokožku (rhizodermis) a primární kůru (cortex) rostliny, čímž vytvářejí útvar označovaný jako Hartigova síť. Houbové hyfy z hyfového pláště rostou ale i směrem od kořínku do půdy a vytvářejí tzv. mimokořenové mycelium. Výše zmíněné části (Hartigova síť, hyfový plášť a mimokořenové mycelium) mají i své specifické funkce. V Hartigově síti dochází k vzájemnému kontaktu a přenosu látek mezi rostlinou a houbou. Hyfový plášť je pro houbu přechodně zásobní částí mycelia, kde se ukládají zásobní látky, zajišťuje povrchový kontakt s kořínkem v místě, kde dochází k produkci rostlinných exsudátů a zároveň rostlinu chrání proti patogenním organismům. Mimokořenové mycelium je velmi důležitou funkční částí ektomykorhizní symbiózy, protože právě tato část proniká do vzdálenějších míst od kořínků, může zde čerpat živiny a transportovat je ať už směrem k rostlině, či do jiných částí mycelia. Anatomické a morfologické struktury mimokořenového mycelia jsou specifické pro různé druhy hub a pronikají do různé vzdálenosti od kořínku. Na základě těchto rozdílů předpokládající odlišné ekologické fungování různých druhů ektomykorhizních hub byl vytvořen koncept tzv. exploračních typů. Tento koncept rozděluje mykorhizní houby zejména na základě množství a délky mimokořenového mycelia a schopnosti vytvářet či nevytvářet rhizomorfy, tedy útvary, kdy se mimokořenové mycelium spojuje do silných provazců (Smith, Read 2008; Agerer, 2001).

Ektomykorhizní symbióza je dominantní zejména v boreálních a temperátních lesích, v nichž bývá značná limitace zejména dusíkem vázaným převážně v organické hmotě. Na rozdíl od hub arbuskulární mykorhizy, ale stejně jako třeba houby erikoidní mykorhizy, mají některé ECM houby enzymatickou výbavu umožňující rozkládat i složitější organické látky a limitující dusík tak mohou zpřístupnit. Zároveň ECM symbióza umožňuje jeho lepší příjem, protože mycelium ECM hub má díky své velikosti (průměr houbové hyfy cca 3 μm) a množství vláken v půdě (až 100 m vláken na 1 cm^3 půdy) až 60 krát větší povrch než rostlinné kořínky (Hobbie, E. A., Hobbie, J. E. 2008). Tento zpřístupněný dusík, stejně jako další minerální látky (fosfor, hořčík, vápník aj.), ektomykorhizní houby využívají pro svou vlastní výživu, ale také poskytují rostlině výměnou za rostlinné asimiláty. Naměřené údaje o množství asimilátů, které houba od rostliny získá, jsou různé a tato rozdílnost zřejmě závisí na environmentálních podmínkách a na fyziologickém stavu obou partnerů. Řádově se pohybují v desítkách procent z celkové produkce.

U ECM symbiomy je rŮznŮy stupeŇ specifickosti mezi oběma partnery. Naprostá většina rostlinných partnerů má nízký stupeŇ specifickosti a vytváří vztah s širokým spektrem vzájemně nepříbuzných houbových partnerů. Předpokládané důvody této nízké specifickosti jsou vyšší pravděpodobnost nalezení symbiotického partnera a zpřístupnění většího spektra živin na základě rŮzné enzymatické výbavy rŮzných ektomykorhizních hub. Ektomykorhizní houby naopak mívají rŮznou míru specifickosti. Některé jsou schopné vytvářet symbiotický vztah se širokým spektrem rostlinných partnerů, ale jiné (např. rod *Suillus*) vytvářejí mykorhizy pouze s jedním rostlinným partnerem (Bruns, 2002, Smith, Read, 2008).

iii. Uhlík, který ECM houby využívají

Ačkoliv v pochopení fungování ektomykorhizního vztahu byl od jeho objevu učiněn velký posun, stále není známa řada aspektů jeho fungování, zejména přesné vztahy toků uhlíkatých látek. Podle Fajardo-López et al. (2008) ECM houby mohou přijímat pouze jednoduché uhlíkaté látky, které se v půdě nacházejí časově i prostorově omezeně, a to buď z uhynulých organismů, nebo jako rostlinné exsudáty. Je otázkou, zda díky tomu mají ECM houby možnost dvojího způsobu života současně, kdy na jednu stranu přijímají rostlinné asimiláty pomocí ektomykorhiz, a na druhou stranu svým mimokořenovým myceliem mohou v půdě možná fungovat jako fakultativní saprotrofové. (Nehls et al., 2010). Faktem ale je, že některé ECM houby mají schopnost rozkladu i složitější organické hmoty, a působí tedy jako dekompozitoři (Lindahl et al., 2007).

Vznik ektomykorhizní hub ze saprotrofních proběhl v evoluci několikrát (Kohler et al., 2015), a tak se míra závislosti na symbiotickém partnerovi a potenciální schopnost samostatné saprotrofní výživy rŮzní v závislosti na míře zachování původních vlastností v dané taxonomické skupině a individuálním vývoji jednotlivých ECM druhů, kterých je v současnosti známo okolo 6 000 a předpokládá se, že jich je 7 – 10 000 (Smith, Read, 2008; Taylor, Alexander, 2005).

Obecně se uvádí, že ECM houby jsou na příjmu uhlíku od rostlin životně závislé (Nehls et al., 2010), nicméně není známo, jestli a kolik uhlíku může ECM houba získat dekompozicí organické hmoty v půdě. Dá se předpokládat, že zjednodušený model fungování ektomykorhizní symbiomy, zvláště z pohledu toků uhlíku, bude ve skutečnosti mnohem složitější a méně jednoznačný. Existuje například studie, která předpokládá, že za určité situace je to naopak ECM houba, která

poskytuje uhlíkaté látky rostlině. Jedná se o opadavé stromy v jarním období, kdy ještě nedošlo k olistění, a tak je omezená tvorba asimilátů (Courty et al, 2007).

iv. Tvorba plodnic u ECM hub

Na rozdíl od hub tvořící erikoidní a arbuskulární mykorhizu, u ECM hub převažuje pohlavní rozmnožování a vytvářejí převážně nadzemní makroskopické plodnice (Tedersoo et al., 2010). Podmínky tvorby plodnic ECM hub nejsou zatím přesně vysvětleny. Na základě výzkumů a pozorování bylo popsáno několik faktorů, které v tomto procesu zřejmě alespoň u části druhů ECM hub hrají významnou roli.

Průběh vztahu houba-rostlina se v temperátních a boreálních lesích zřejmě mění v během roku na základě střídání ročních období a vývoji rostliny v průběhu vegetační sezóny. Na začátku vegetační sezóny rostliny nejvíce investují do rozvoje asimilačních orgánů a do růstu nadzemních částí, primárně do hlavních růstových pupenů a až následně do vedlejších růstových pupenů. Až v druhé polovině sezóny, která v boreálních a temperátních lesích začíná zhruba v polovině srpna, začínají rostliny investovat do růstu kořenového systému. Toto období je zároveň i hlavní sezónou, kdy se začínají objevovat plodnice ECM hub. Kromě těchto pozorování existují i experimentálně ověřená data, která u semenáčků inokulovaných *Laccaria bicolor* manipulovala s fotoperiodou, kdy snížení doby osvětlení z 12 h na 9 h při zachování stejné teploty vyvolalo tvorbu plodnic. Pouhé snížení teploty naopak nevyvolalo žádnou odezvu. Také bylo zjištěno, že na rychlost vývoje plodnice *L. bicolor* má vliv intenzita osvětlení rostliny, kdy při vyšších intenzitách osvětlení a tedy potenciálně lepších podmínkách pro fotosyntézu rostliny dozrává plodnice do dospělého stádia dříve než při nižších osvětleních. Byl prokázán ale i vliv opačným směrem, kdy odstranění plodnice vedlo ke snížení intenzity fotosyntézy a přívření průduchů rostliny až do chvíle, než začala vznikat plodnice nová (Khasa et al, 2009). Högberg et al. (2009) zjistili, že pokud je u stromů tvořících ECM symbiózu uměle na velké ploše (v jejich případě 707 m²) přerušen tok rostlinných asimilátů do půdy (v angličtině označováno jako tzv. girdling), dojde k významnému snížení produkce plodnic ECM hub.

v. Ektomykorhizní houby a disturbance

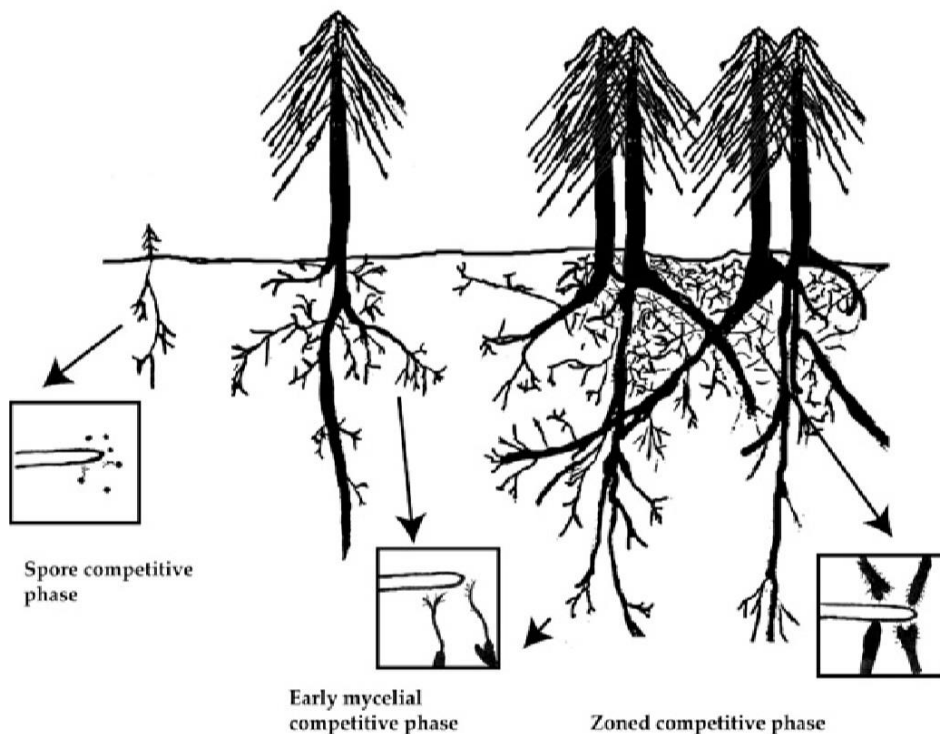
Po disturbancích způsobených kůrovcem a větrem dochází k tzv. sekundární sukcesi, tedy sukcesi v již existujícím a pouze narušeném ekosystému. Při bezzásahovém režimu se odumřelé stromy

vrací do koloběhu a stávají se zdrojem potravy pro velké množství organismů. Nejprve jsou využívány snadno rozložitelné organické látky a tímto rozkladem se do půdy nárazově dostává zvýšené množství živin jak v organické, tak v anorganické formě. Takové látky jsou ale rychle spotřebovány, snadno dostupných živin rychle ubývá a mezi rostlinami dochází ke konkurenci o ně. Předpokládá se, že mykorhizní symbióza se v tomto stádiu stává významnou výhodou, jelikož houby jsou schopné živiny vázané v organické hmotě získávat a poskytovat je rostlinám. U ECM symbiózy se předpokládá, že v temperátních a boreálních lesích způsobuje dominanci stromů z čeledí bukovité (*Fagaceae*) a borovicovité (*Pinaceae*) právě kvůli živinovému stavu ekosystémů, které přecházejí z iniciálních stádií bohatých na anorganické formy N do pozdních stádií, kdy je N vázaný v organických formách v hromadícím se opadu (Smith, Read, 2008; Nehls et al., 2010).

Z výsledků prací zkoumajících druhové složení ECM hub v uměle, převážně na orné půdě založených lesních porostech vznikl koncept o ECM houbách vázaných na různá stadia lesa. Tento koncept dělí les do mladého a pozdního stadia, přičemž mladé stádium je definováno jako porost, ve kterém nedošlo k zapojení stromových korun, a tak je v něm lépe osvětlený půdní povrch, a pozdní stádium jako les se zapojenými korunami, a tak méně osvětleným půdním povrchem a hromadícím se opadem. Dle nálezů v daných stádiích se ECM houby dělí na tzv. houby mladých stádií, houby pozdních stádií a vícestádiové houby (early, late, multistage species). Tento zjednodušený koncept zřejmě do určité míry postihuje vázanost některých ECM hub na osvětlený či neosvětlený půdní prostor, nicméně daná pozorování byla provedena v člověkem uměle vytvořených podmínkách, které se značně liší od podmínek přírodních ekosystémů (narušením půdního povrchu, věkovou uniformitou porostu, pravidelným prostorovým uspořádáním aj.), a tak fungování stejných druhů ECM hub v přírodních může být do určité míry odlišné (Mason et al., 1983).

Koncept rozlišování hub mladých a pozdních stádií je v literatuře někdy také používán v kontextu přesného věku stromů, kdy se zdálo, že některé druhy hub kolonizují pouze mladé semenáčky (např. mladší než 5 let) a jiné naopak stromy starší (např. starší než 13 let) (Mason et al., 1983). Později ale bylo zjištěno, že způsob kolonizace je zřejmě jiný. Některé ECM houby, typicky označované jako houby mladých stádií, jsou schopné kolonizovat mladý semenáček vyklíčením hyf z basidiospor, a některé ECM houby, typicky označované jako houby pozdních stádií,

kolonizují semenáček pomocí již existujícího mycelia rostoucího z dospělého stromu v určité vzdálenosti. Jinými slovy i velmi mladý semenáček může být kolonizovaný houbami pozdního stádia, pokud v jeho blízkosti roste starší strom kolonizovaný těmito houbami (Peay et al., 2011).



Obr. 1.: Koncept sukcese ECM hub založený na prostorové a časové změně hustoty kořenů. V rámečcích jsou znázorněny jednotlivé fáze, přičemž bílá výplň značí nemykorhizní kořínky, které jsou kolonizovány buď sporami nebo mycelium z mykorhizních kořínků (tmavá výplň).

1) Fáze kompetice spor (Spore competitive phase) – nejvíce kompetičně zdatné spory kolonizují kořínky jako první. 2) Fáze prvotní kompetice mycelia (Early mycelial competitive phase) – kořínky kolonizují méně četné a kompetičně slabší spory, ale i mimokořenové mycelium ze vzdálenější ektomykorhizy (explorační typy mimokořenového mycelia na střední a dlouhé vzdálenosti) 3) Fáze zónační kompetice – zóny vysoké hustoty kořenů jsou typické kompeticí hub vytvářející explorační typ mimokořenového mycelia na krátkou vzdálenost a zóny s nižší hustotou kořenů (typicky v hlubších vrstvách půdy) opět kompeticí hub středních a dlouhých exploračních typů. Převzato z Peay et al. (2011).

Jak bylo uvedeno v předchozích kapitolách, ECM houby jsou životně závislé na svých rostlinných partnerech. Pokud tedy dojde k poškození vegetace působením ekologické disturbance, jsou nepřímo poškozeny i ECM houby. V porostech *Pinus concorta* poškozených kůrovcem (*Dendroctonus ponderosae*) bylo dokázáno, že se zvyšujícím se procentem poškozených stromů dochází k postupnému úbytku ECM hub, a to jak jejich plodnic (Treu et al., 2014) i sekvencí DNA v půdě (Pec et al., 2017). Pomocí sekvencí DNA ektomykorhizních hub izolovaných z půdy Štursová et al. (2014) zjistili, že při úplném odumření stromového patra po gradaci kůrovce (*Ips typographus*) v přirozeném porostu smrku (*Picea abies*) došlo zhruba po 3 letech od disturbance k úplnému vymizení sekvencí ECM hub. Senn-Irlet a Bieri (1998) popisují, jaký vliv měl na ECM houby rozpad části stromového patra v horském smrkovém lese vlivem větru. Výsledky ukázaly, že v regenerujících plochách bylo zaznamenáno více ECM plodnic od menšího množství druhů, kdežto v nepoškozených plochách se vyskytovalo více druhů tvořících menší množství plodnic. Vašutová et al. (2018) popisují složení ECM společenstva na plochách horských smrčín v Tatrách 10 let po větrné disturbanci, přičemž každá z ploch měla jiný následný vývoj (bezzásahová plocha, vytěžená plocha, přirozený požár, referenční nedisturbovaná plocha). Výsledky této práce založené na sekvenování DNA z půdy ukázaly, že všechny disturbované plochy měly oproti referenční ploše nižší počet ECM druhů, přičemž bezzásahová plocha měla vůči referenční ploše nejpodobnější druhové složení. Pro všechny disturbované plochy byly dominantní sekvence druhu *Thelephora terrestris* doprovázené druhem *Tylospora fibrillosa* na bezzásahové ploše a druhem *Tylospora asterophora* na plochách po ohni a těžbě.

2. CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem této práce je zhodnocení vývoje společenstva ektomykorhizních hub na 4 trvalých výzkumných plochách v NP a CHKO Šumava v různém stupni narušení stromového patra na základě monitoringu plodnic během let 2007 – 2014 a 2018 doplněným daty o environmentálních faktorech prostředí z let 2007 – 2014 (srážky, teplota, půdní chemismus), daty o vegetaci z roku 2018 a daty o ECM houbách získaných pomocí sekvenace DNA půdních vzorků z roku 2018.

Na 2 plochách situovaných u Plešného jezera dochází od roku 2007 k celkové regeneraci daného ekosystému po odumření stromového patra způsobeného kůrovcem a větrnou disturbancí.

Výsledky pozorování by tedy měly do určité reflektovat vývoj sekundární sukcese ECM hub.

Ačkoliv není známo druhové složení před disturbancemi, předpokládá se následující:

- Po odumření stromového patra došlo ke značné redukci i u ECM a v nejbližších letech po disturbanci bude množství druhů i plodnic nízké.
- S postupnou obnovou vegetace dochází i k obnově ECM symbiózy, a tak přibývá druhů i plodnic ECM hub.
- Budou se objevovat jak druhy ECM hub typické pro mladá stádia lesa, tak druhy typické pro pozdní stádia.

Během monitoringu 2 ploch u Čertova jezera mezi roky 2007 – 2014 zůstalo stromové patro zachováno. Na obou dvou plochách docházelo k bodovému napadení stromů kůrovcem, přičemž jedna z ploch byla tvořena dominantně smrkem a druhá měla příměs buku a jedle. U těchto ploch se proto předpokládá:

- Mezi roky 2007 – 2014 bude vývoj ECM společenstva na těchto plochách méně dynamický než u ploch u Plešného jezera a bude vázaný převážně na environmentální faktory, zejména počasí.

V říjnu roku 2017 došlo na ploše s dominantním smrkem (CJH) k rozpadu stromového patra vlivem vichřice. Předpokládá se proto:

- Při monitoringu v roce 2018 bude výrazný úbytek ECM druhů.

3. MATERIÁLY A METODY

I. LOKALITY

Byly monitorovány dvě lokality – lokalita v povodí Plešného jezera a v lokalita v povodí Čertova jezera. Na každé lokalitě jsou vymezeny 2 trvalé plochy Hydrobiologického ústavu BC, které se umístěním shodují s monitorovanými plochami použitými v této práci.

i. Plochy u Plešného jezera

Obě dvě plochy u Plešného jezera se nacházejí v I. zóně NP Šumava, tedy v takzvané zóně přírodní, jejímž cílem je zachování a umožnění nenarušovaného průběhu přírodních procesů v ekosystémech, které jsou na základě průzkumu označovány jako přirozené. U Plešného jezera se jedná o horské třtinové smrčiny (*Calamagrostis villosae-Piceetum*). Podloží je zde tvořeno granitem.

Plocha nazvaná Plešné jezero – památník (dále jen PJP) se nachází JZ od Plešného jezera nad památníkem Adalberta Stiftera (N 48,7767; E 13,8547). Odumření stromového patra po napadení kůrovcem nastalo v roce 2005 a k jeho plošnému rozpadu došlo v lednu roku 2007 po orkánu Kyrill. (Matějka, 2018).

Druhá plocha nazvaná Plešné jezero – u jezera (dále jen PJJ) se nachází V od Plešného jezera (N 48,7752; E 13,868). K napadení kůrovcem zde došlo v roce 2006, k výraznému narušení stromového patra došlo rovněž v roce 2007 po orkánu Kyrill a zbytek stromového patra odumřel po gradaci kůrovce v letech 2007 – 2008 (Matějka, 2018).

ii. Plochy u Čertova jezera

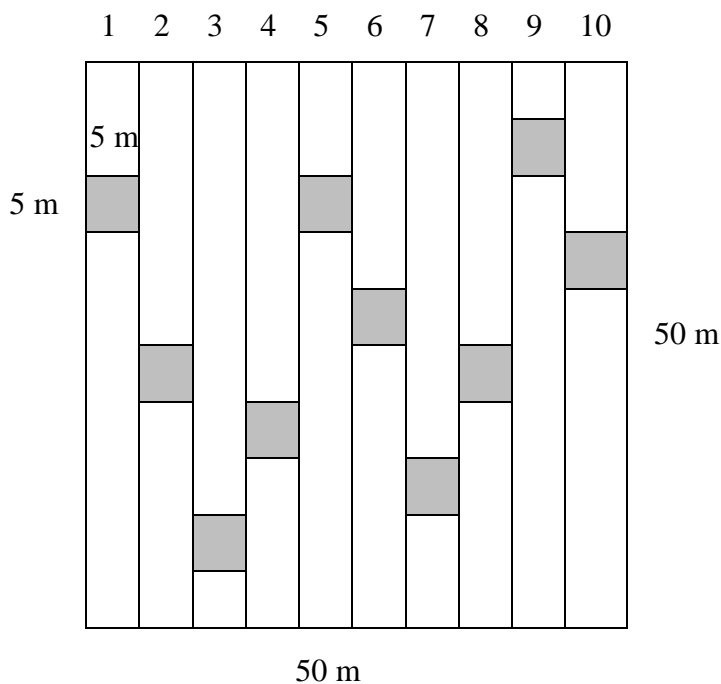
Plochy u Čertova jezera se nacházejí v CHKO Šumava. Podloží tvoří metamorfovaná hornina svor (muskovitická rula) s intruzí křemence. Okolí Čertova jezera bylo prokazatelně v minulosti hospodářsky využíváno. Gradace kůrovce, která zasáhla šumavské lesy, zde byla potlačována průběžnou těžbou napadených smrků, čímž ale na některých místech vznikly holiny. S výjimkou asanovaných ploch po kůrovci a polomech po orkánu Kyrill (2007) zůstalo stromové patro v okolí Čertova jezera zachováno. Druhové složení E3 bylo tvořeno převážně smrkem (*Picea abies*), jehož věk byl v roce 2002 uváděn na 90 – 150 let (Kopáček a kol., 2002b), ale také jeřábem (*Sorbus aucuparia*), jedlí (*Abies alba.*) a bukem (*Fagus sylvatica*) (Matějka, 2018).

Plocha nazvaná Čertovo jezero-horní (dále jen CJH) se nachází západně od Čertova jezera v oblasti NPR Černé a Čertovo jezero v I. zóně CHKO (N 49,1696; E 13,1858). Jedná se o ekosystém horské třtinové smrčiny (*Calamagrostis villosae-Piceetum*) (viz. výše). I v této NPR došlo v průběhu 90. let k odumírání stromového patra vlivem kůrovce a větru, zvláště pak působením orkánu Kyrill v roce 2007. Vzhledem k režimu v CHKO byly prováděny zásahy proti šíření kůrovce. V samotné trvalé výzkumné ploše zůstalo stromové patro zachováno, ale ocitla se v okrajových zónách vzrostlého lesa na svahu. Působení kůrovce bylo pouze bodové, ale v říjnu roku 2017 došlo ke zničení stromového patra při orkánu Herwart.

Plocha Čertovo jezero-dolní (dále jen CJD) se nachází JV od Čertova jezera v II. zóně CHKO (N 49,1627; E 13,1993). Stromové patro, jehož složení bylo zřejmě v minulosti pozměněno člověkem, tvoří smrk (*Picea abies*) s příměsí buku (*Fagus sylvatica*) a jedle (*Abies alba*) (viz. Přílohy Tab. 3). Zasažení kůrovcem na dané lokalitě bylo pouze bodové a nedošlo k plošnému narušení stromového patra.

II. USPOŘÁDÁNÍ TRVALÝCH PLOCH

Trvalá plocha měla velikost 50 x 50 m, přičemž byla dále rozdělena na 10 pruhů o šířce 5 m. V těchto pruzích pak byla plocha procházena a byly zaznamenávány druhy plodnic ECM hub a jejich počty. V roce 2018 pak byla v každém z 10 pruhů vytyčena malá podplocha o velikosti 5 x 5 m, kde kromě záznamu plodnic hub byla zaznamenána i vegetace (určení a procentuálně vyjádřená pokryvnost ve vegetačním snímku – viz Přílohy Tab. 3) a byla odebrána půda (O+A horizont) a byla odebrána půda (O+A horizont) na environmentální sekvenování. Průzkum ploch a určení plodnic v letech 2008 – 2014 i 2018 prováděl Miroslav Beran se spolupracovníky z Ústavu výzkumu globální změny AV ČR. Několik návštěv (zejména v letech 2011 a 2018) uskutečnila Martina Vašutová.



Obr. 2: Schéma trvalých ploch, kdy celková plocha 50 x 50 m je rozdělena na 10 pásů, v nichž jsou náhodně umístěny menší podplochy (šedé čtverečky) o velikosti 5 x 5 m.

III. METODY

V případě nejistého určení byla plodnice doložena herbářovou položkou a určována pomocí mikroznaků. Pomocí mikroznaků byly určovány i houby tvořící rozlité plodnice (dále v textu označená jako kornatce, či kornatcovité houby), jejichž sběr probíhal pouze v roce 2018. Tyto houby byly dříve řazeny do čeledi kornatcovité (*Corticaceae*), ale ukázalo se, že tato skupina nemá fylogenetickou podporu a je tvořena vzájemně nepříbuznými taxony. Mikroskopické určení proběhlo s využitím těchto publikací: Bernicchia, Gordón (2010); Knudsen, Vesterholt (2018); Brandrud et al. (1990-1998); Beker et al. (2016); Sarnari (2005). Houby byly mikroskopovány v 5 % KOH, 1 % vodném roztoku Kongo červeně nebo Melzerově činidle (Clémenton, 2009).

Z vybraných položek, které nebylo možné určit podle makro a mikroznaků, případně z položek druhů, jejichž sekvence byly málo zastoupeny ve veřejných databázích byla získána sekvence nukleotidů oblasti ITS, která se používá jako barkód (Schoch et al., 2012).

Izolace DNA proběhla pomocí CTAB metody (podrobný popis postupu viz. Přílohy) nebo Plant DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) dle návodu výrobce. Vyizolovaná DNA byla amplifikována

pomocí ITS1F a ITS4 (White et al., 1990). Podmínky PCR reakce byly následující – 2:30 min při 94 °C, 37 cyklů (30 s při 94 °C, 40 s při 50 °C a 50 s při 72 °C), finální elongace 4:30 min při 72°C. Sekvenování bylo provedeno firmou GATC Biotech. Výsledné sekvence byly manuálně upravovány v programu FinchTV a porovnávány se sekvencemi v databázích GenBank a Unite.

DNA byla ze vzorků půdy izolována pomocí kitu DNEasy PowerSoil Kit (MoBio, USA), dle návodu výrobce (podrobný popis postupu viz. Přílohy). Výsledné sekvence DNA byly zpracovány tak, že byly vybrány ITS sekvence hub, byly vyřazeny sekvence kratší než 150bp, seskupeny podle 98,5 % podobnosti a taxonomicky přiřazovány za využití databáze Unite (podrobný popis postupu viz. Přílohy). Z výsledného souboru pak byly ručně vybírány taxony přiřazené k druhům, případně rodům ECM hub a to dle dostupné literatury (Tedersoo et al., 2010; Rinaldi et al., 2008).

Pro vyhodnocení vlivu environmentálních faktorů byl použit program Canoco 5, konkrétně analýzy Detrended Correspondence Analysis (DCA), Principal Component Analysis (PCA) a Interactive Forward Selection.

Podíl autorky práce na získávání dat

Data o monitoringu plodnic a environmentální data z let 2007 – 2014 mi byla poskytnuta, účastnila jsem se pouze monitoringu a odběrů v roce 2018. Při laboratorním zpracování dat jsem mikroskopicky určovala kornatcovité houby a podílela se na molekulárním určování vybraných položek plodnic. Data o sekvencích DNA z půdy mi rovněž byla poskytnuta.

4. VÝSLEDKY

I. PLODNICE

i. Druhové složení a společné znaky všech ploch

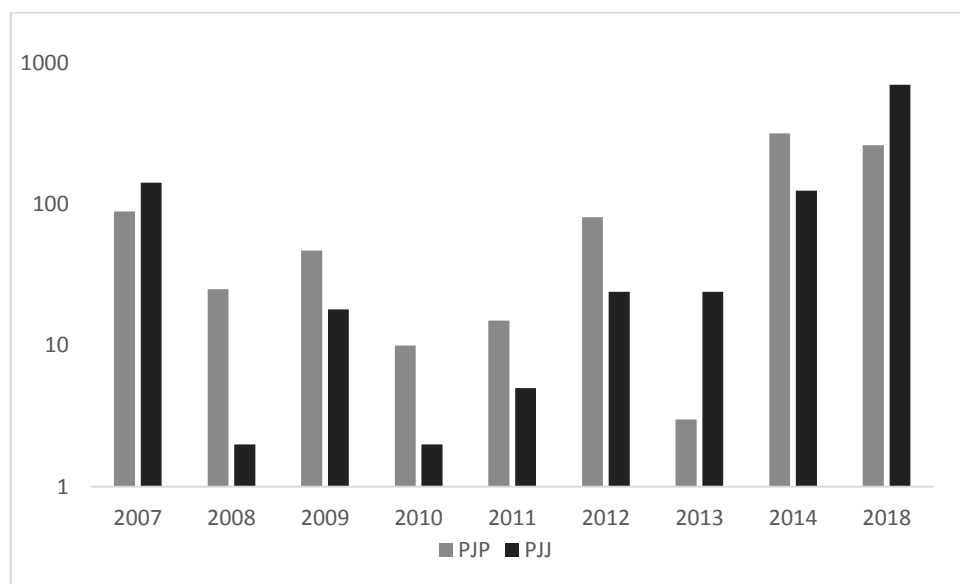
Během celého monitoringu plodnic (2007– 2014, 2018) bylo na všech plochách zaznamenáno celkem 84 druhů ECM hub (viz. Přílohy Tab. 1 a 2) a 9 neurčených. U většiny plodnic (kromě plodnic kornatcovitých hub z roku 2018) proběhla identifikace přímo v terénu dle morfologických znaků, doloženo bylo zhruba 90 položek. 61 položek bylo vybráno na sekvenování, z toho DNA byla úspěšně extrahována z 51 položek, kvalitní ITS sekvence byly získány pouze z 41 položek (viz. Přílohy Tab 4).

Kornatcovitých hub bylo v roce 2018 na všech plochách sebráno 99 položek (PJP – 34, PJJ – 16, CJH – 16, CJD – 33), přičemž z plochy PJP bylo později určeno jako ECM 14 položek, z plochy PJJ 7 položek, na ploše CJD 4 položky a na ploše CJH pouze 1 položka. Nalezeny byly druhy *Amphinema byssoides*, *Piloderma byssinum*, *Tomentella sp.*, *Tylospora asterophora* a *Tylospora fibrillosa* (podrobnější přehled Přílohy Tab. 2).

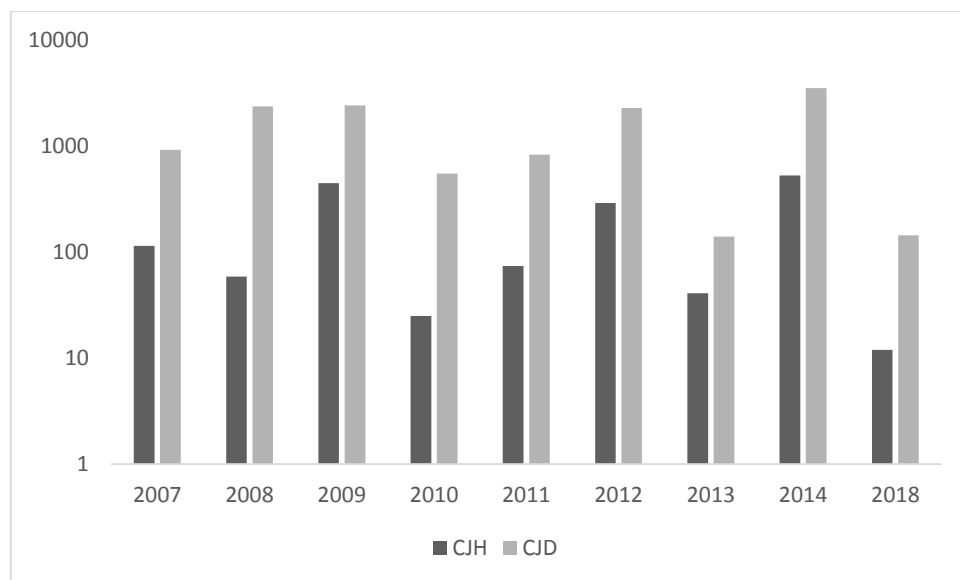
Nejvyšší celkový počet ECM druhů zaznamenaných pomocí monitoringu plodnic za celou dobu sledování byl 65 na ploše CJD. Na ploše PJP bylo celkem zaznamenáno 30 druhů, na ploše PJJ 28 druhů a nejmenší celkový počet byl 25 druhů na ploše CJH. Z tabulky 1 a obrázků 3 a), b) vyplývá, že v průběhu monitoringu nedošlo na žádné ze sledovaných lokalit k úplnému vymizení plodnic ECM druhů hub, přestože na některých z nich došlo ke kompletnímu rozpadu stromového patra. Na disturbovaných plochách došlo po rozpadu stromového patra k výraznému snížení počtu plodnic i druhů, ale v průběhu snižování jsou mezi plochami u Plešného jezera a plochou CJH u Čertova jezera vidět rozdíly, a to zřejmě z důvodu rozdílného mechanismu působení disturbancí. U Plešného jezera byl v nejbližší sezóně po disturbanci zaznamenán ještě relativně vysoký počet druhů i plodnic ECM a až v následujících letech došlo ke značnému poklesu. U CJH byl v nejbližší sezóně po disturbanci zjištěn okamžitý pokles druhů i plodnic, Oproti plochám PJJ, PJP a CJH byly počty druhů i plodnic na nenarušené ploše CJD vždy výrazně vyšší – u počtů plodnic byl někdy rozdíl až 3 řády.

Tab 1: Počty (P) a druhy (D) plodnic ECM druhů na jednotlivých plochách (L) v letech 2007 – 2014 a 2018. K odumření stromového patra došlo na plochách v různých letech (O).

		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2018	
L	O	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D
CJH	2017	115	7	59	6	450	15	25	4	74	10	292	11	41	6	532	15	12	3
CJD	-	927	32	2374	42	2424	36	551	33	836	23	2301	36	140	17	3546	39	144	20
PJP	2003	89	9	25	3	47	6	10	2	15	4	81	6	3	2	318	12	262	12
PJJ	2006	142	13	2	2	18	5	2	1	5	2	24	4	24	4	125	10	702	15



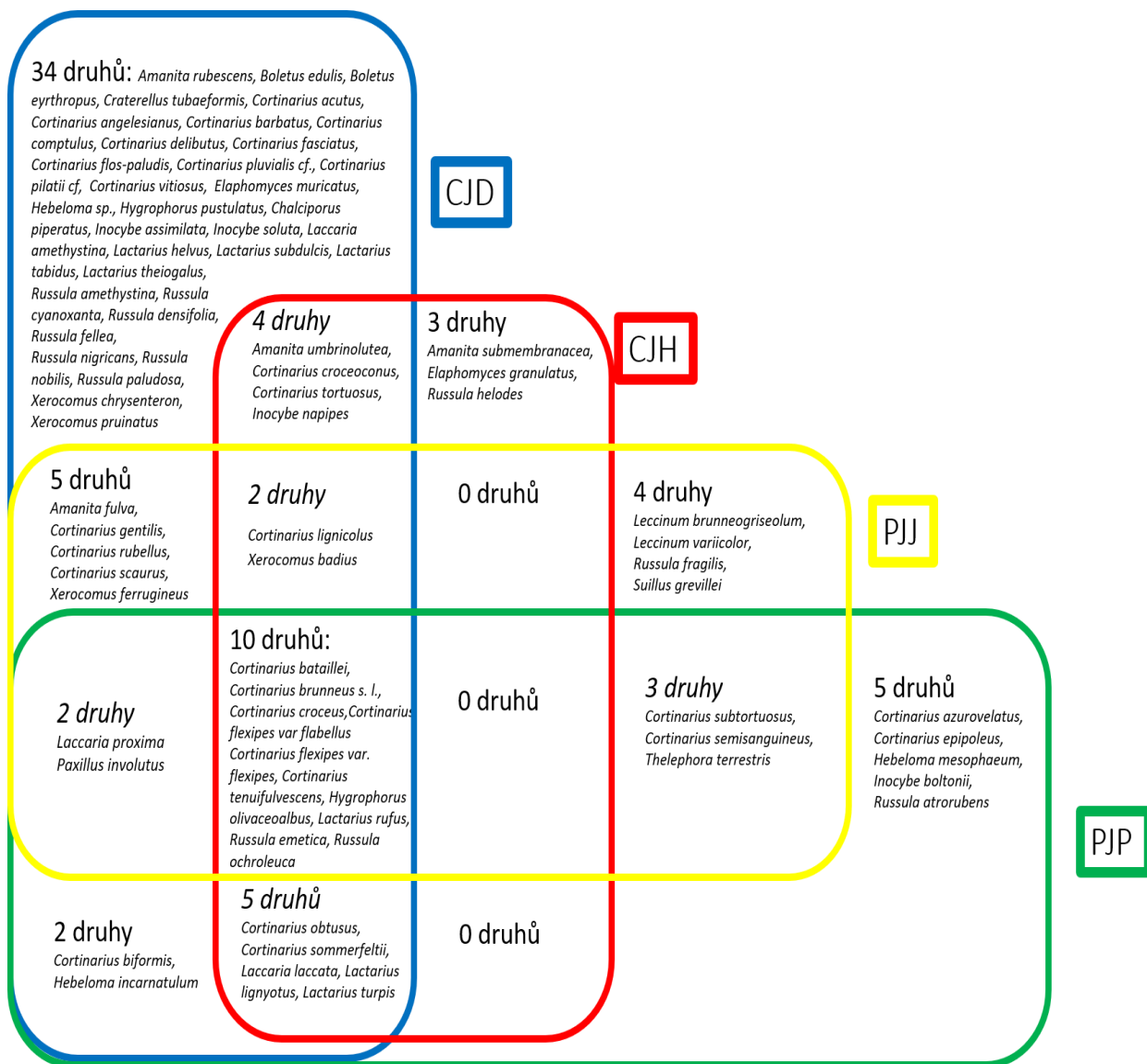
a)



b)

Obr. 3 a), b): Log počtu plodnic ECM druhů na jednotlivých lokalitách (a) PJP, PJJ; b) CJH, CJD) v letech 2007–2014 a 2018.

Všechny plochy měly 9 společných druhů ECM hub (*Cortinarius bataillei*, *Cortinarius brunneus*, *Cortinarius croceus*, *Cortinarius flexipes*, a to variety *flabellus* i *flexipes*, *Cortinarius tenuifulvescens*, *Hygrophorus olivaceoalbus*, *Lactarius rufus*, *Russula emetica* a *Russula ochroleuca*) a počet jejich plodnic se na jednotlivých plochách lišil a různě kolísal. Ačkoliv složením původního stromového patra si byly plochy CJH, PJJ a PJP blízké, nebyl v průběhu monitoringu zaznamenán žádný pouze pro ně společný ECM druh. Pro plochy CJD, CJH a PJJ byly společné druhy *Cortinarius lignicolus* a *Xerocomus badius*. Pro plochy CJD, CJH a PJP byly společné druhy (5) *Cortinarius obtusus*, *Cortinarius sommerfeltii*, *Laccaria laccata*, *Lactarius lignyotus* a *Lactarius turpis*. Pro plochy CJD, PJJ a PJP byly společné dva ECM druhy – *Laccaria proxima* a *Paxillus involutus*. Pro obě plochy u Plešného jezera byly společné druhy (3) *Cortinarius subtortuosus*, *Cortinarius semisanguineus* a *Thelephora terrestris*. Společné druhy lokality u Čertova jezera byly *Amanita umbrinolutea*, *Cortinarius croceoconus*, *Cortinarius tortuosus* a *Inocybe napipes*. Každá plocha měla i druhy jedinečné pouze pro ni, ale opět byly během monitoringu nalézány s různou frekvencí. Nejvíce unikátních druhů (nalezených pouze na 1 ploše) měla CJD (34), PJP měla 5 druhů, PJJ 4 druhy a CJJ 3 druhy (obr 4).



Obr. 4: Vennův diagram zobrazující všechny druhy plodnic ECM hub (kromě 5 druhů kornatcovitých hub) nalezených během monitoringu v letech 2007 – 2014 a 2018.

ii. Vývoj společenstva hub na jednotlivých plochách

Plocha PJP

Na této ploše došlo k masivnímu odumření stromového patra v důsledku kůrovcové gradace v roce 2005 a ke vzniku polomů v roce 2007 po orkánu Kyrill. Při obnově stromového patra se kromě smrku (*Picea abies*) začaly objevovat i další stromy (, z druhů tvořících ektomykorhizu to byla zejména bříza (*Betula pendula*). Dle vývoje společenstva byly ECM na této ploše rozděleny do 4 skupin:

- 1) **Zmizelé ECM houby** – byly viděny pouze v prvních letech monitoringu (2007–2010)
- 2) **Znovu zaznamenané ECM houby** – byly viděny v prvních letech monitoringu (2007-2010) a znovu byly zaznamenány až v posledních letech monitoringu (2014, 2018)
- 3) **Nově zaznamenané** – byly zaznamenány alespoň 5 let po disturbanci (2012–2014, 2018)
- 4) **Stálé druhy** – byly zaznamenány alespoň v 5 letech z 9.

Jediným druhem, který nebyl zařazen do žádné z těchto kategorií, je *Lactarius lignyotus* nalezený v letech 2009, 2012 a 2014. Shrnutí těchto skupin je zobrazeno v tabulce 2.

Tab. 2: ECM druhy (PJP) rozděleny do výše zmíněných kategorií dle času a frekvence nálezu.

Zmizelé ECM houby, znovu zaznamenané ECM houby, nově zaznamenané, stálé druhy.

Druhy ECM hub	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2018
<i>Cortinarius azureovelatus</i>	X								
<i>Cortinarius epipoleus</i>		X		X					
<i>Cortinarius brunneus s.l.</i>	X								
<i>Cortinarius subtortuosus</i>	X		X						
<i>Lactarius turpis</i>	X								
<i>Cortinarius flexipes var. flex</i>	X							X	
<i>Cortinarius sommerfeltii</i>		X						X	
<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>			X						X
<i>Lactarius rufus</i>			X						X
<i>Cortinarius biformis</i>									X
<i>Cortinarius flexipes var. flab.</i>								X	
<i>Cortinarius obtusus</i>								X	
<i>Cortinarius semisanguineus</i>									X
<i>Hebeloma incarnatulum</i>						X			
<i>Hebeloma mesophaeum</i>									X
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>								X	X
<i>Inocybe boltonii</i>									X
<i>Laccaria laccata</i>									X
<i>Laccaria proxima</i>						X			
<i>Paxillus involutus</i>								X	
<i>Russula atrorubens</i>									X
<i>Thelephora terrestris</i>									X
<i>Cortinarius bataillei</i>			X		X	X	X	X	X
<i>Cortinarius croceus</i>			X		X	X		X	X
<i>Russula emetica</i>	X				X	X		X	X
<i>Russula ochroleuca</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Plocha PJJ

Na této ploše došlo k masivnímu odumření stromového patra v důsledku kůrovcové gradace v roce 2006 a ke vzniku polomů v roce 2007 po orkánu Kyrill. I zde se ve při obnově stromového patra objevovaly kromě smrku další dřeviny. Pro ECM symbiózu byly nejdůležitějšími břízy (*Betula pendula* a *Betula pubescens*) a modřín (*Larix decidua*). I zde byl vývoj ECM společenstva dle nálezů plodnic rozdělen do 4 skupin dle období a frekvence nálezů, ale druhové složení v daných skupinách bylo částečně odlišné než na ploše PJP.

- 1) **Zmizelé ECM houby** – byly viděny pouze v prvních letech monitoringu (2007–2010).
- 2) **Znovu zaznamenané ECM houby** – byly viděny v prvních letech monitoringu (2007–2010) a znovu byly zaznamenány až v posledních letech monitoringu (2014, 2018).
- 3) **Nově zaznamenané** – byly zaznamenány alespoň 5 let po disturbanci (2012–2014, 2018).
- 4) **Stálé druhy** – byly zaznamenány alespoň v 5 letech z 9.

Shrnutí těchto skupin je zobrazeno v tabulce 3.

Při dělení do výše zmíněných kategorií byly mnohé druhy, které byly nalezeny na obou plochách u Plešného jezera, zařazeny do odlišných kategorií. Vyskytly se ale také druhy, u nichž bylo zařazení do kategorií shodné. V kategorii 1) Zmizelé druhy byly v obou případech *Cortinarius brunneus* a *Cortinarius subtortuosus*. V kategorii 2) Znovu zaznamenané byl pro obě plochy společný *Lactarius rufus*. Na obou plochách byly nově zaznamenány (3. kategorie) *Laccaria proxima* a *Thelephora terrestris*. Ve 4. kategorii (Stále přítomné) byly rovněž zaznamenány dva stejné druhy, *Cortinarius bataillei* a *Russula ochroleua*.

Tab. 3: ECM druhy (PJJ) rozděleny do výše zmíněných kategorií dle času a frekvence nálezu.

Zmizelé ECM houby, znovu zaznamenané ECM houby, nově zaznamenané, stálé druhy.

Druhy ECM hub	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2018
<i>Amanita fulva</i>	X								
<i>Cortinarius brunneus s.l</i>	X								
<i>Cortinarius flexipes var. flex</i>	X								
<i>Cortinarius gentilis</i>	X								
<i>Cortinarius lignicolus</i>		X							
<i>Cortinarius subtortuosus</i>	X								
<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>			X	X					
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>		X							
<i>Xerocomus ferrugineus</i>	X								
<i>Cortinarius flexipes var. flab</i>	X							X	
<i>Cortinarius semisanguineus</i>	X								X
<i>Cortinarius rubellus</i>	X							X	
<i>Lactarius rufus</i>			X						X
<i>Russula emetica</i>	X							X	X
<i>Cortinarius croceus</i>								X	X
<i>Cortinarius scaurus</i>									X
<i>Laccaria proxima</i>						X	X	X	X
<i>Leccinum brunneogriseolum</i>									X
<i>Leccinum variicolor</i>									X
<i>Russula fragilis</i>								X	
<i>Suillus grevillei</i>									X
<i>Thelephora terrestris</i>									X
<i>Cortinarius bataillei</i>					X	X	X	X	X
<i>Paxillus involutus</i>	X		X			X	X	X	X
<i>Russula ochroleuca</i>	X		X		X			X	X
<i>Xerocomus badius</i>	X		X			X	X	X	X

Plocha CJH

Vzhledem k tomu, že větrná disturbance, která zničila stromové patro, zde proběhla až v roce 2017, byly ECM houby rozděleny do 4 kategorií – 3 kategorie dle frekvence nálezu plodnic, 1 kategorie dle hub nalezených po disturbanci:

- 1) **Zaznamenány 1x za monitoring**
- 2) **Zaznamenány 2 - 4x za monitoring**
- 3) **Zaznamenány 5x a vícekrát**
- 4) **Zaznamenány v roce 2018 (po rozpadu stromového patra)**

Shrnutí těchto kategorií je zobrazeno v tabulce 4.

Plocha CJD

Na této ploše v době monitoringu došlo pouze k bodovému odumření stromů a celkové stromové patro zůstalo zachováno. ECM houby byly tedy rozděleny do 3 kategorií dle frekvence nálezů plodnic, ale vzhledem k druhové početnosti plochy jsou jednotlivé druhy hub uvedeny v tabulkách v kapitole Přílohy a zde jsou uvedeny pouze kategorie a jejich početnost.

- 1) **Zaznamenány 1x za monitoring (20 druhů hub)**
- 2) **Zaznamenány 2 - 4x za monitoring (16 druhů hub)**
- 3) **Zaznamenány 5x a vícekrát za monitoring (28 druhů hub)**

Tab. 4: ECM druhy (CJH) rozděleny do výše zmíněných kategorií dle frekvence nálezu. 1 x za monitoring, 2 – 4 x za monitoring, 5 x a vícekrát za monitoring. Tučné písmo a tmavé ohraničení značí kategorií zaznamenaný v roce 2018 (po rozpadu stromového patra).

Druhy ECM hub	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2018
<i>Amanita submembranacea</i>								X	
<i>Cortinarius croceoconus</i>		X							
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flabellus</i>			X						
<i>Cortinarius lignicolus</i>		X							
<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>									X
<i>Elaphomyces granulatus</i>					X				
<i>Lactarius turpis</i>								X	
<i>Russula helodes</i>					X				
<i>Amanita umbrinolutea</i>			X					X	
<i>Cortinarius croceus</i>			X					X	
<i>Cortinarius obtusus</i>			X					X	
<i>Cortinarius sommerfeltii</i>	X					X			
<i>Cortinarius tortuosus</i>			X	X		X			
<i>Inocybe napipes</i>			X		X	X		X	
<i>Laccaria laccata</i>			X			X	X		
<i>Lactarius lignyotus</i>			X			X		X	
<i>Lactarius rufus</i>	X							X	
<i>Russula emetica</i>			X		X	X		X	
<i>Cortinarius bataillei</i>		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Cortinarius brunneus</i> s.l.	X		X	X	X	X	X	X	
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flexipes</i>	X		X		X	X		X	
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Russula ochroleuca</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Xerocomus badius</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Na základě rozdělení do výše zmíněných kategorií na všech plochách, byla u některých ECM hub zjištěna podobná reakce na stav lesa. *Cortinarius brunneus* byl na plochách u Plešného jezera nalezen pouze první rok po disturbanci. Na ploše CJH se tento druh s výjimkou roku 2008 objevoval v průběhu celého monitoringu 2007 – 2014, ale nebyl nalezen v nejbližší sezóně po disturbanci, a na nedisturbované ploše CJD byl nacházen ve všech letech monitoringu. *Russula ochroleuca* byla na obou plochách u Plešného jezera relativně pravidelně nacházeným druhem a byla nalezena alespoň v 5 let z 9, stejně jako na obou plochách u Čertova jezera, kde ovšem nebyla nalezena ani na jedné ploše v roce 2018. Na všech plochách nejčastěji nacházeným druhem byl *Cortinarius bataillei*. Na plochách u Plešného jezera sice nebyl nalezen v prvních letech po disturbanci, ale od prvních nálezů (PJP 2009, PJJ 2011) byl druhem relativně pravidelně nacházeným. Na plochách u Čertova jezera se objevoval ve všech letech monitoringu a na ploše CJH byl zaznamenán i v roce 2018 po disturbanci. *Xerocomus badius* byl společným druhem pouze pro plochy PJJ, CJH a CJD, ale na všech plochách se choval podobným způsobem, kdy byl opět víceméně stabilním druhem během všech let monitoringu.

iii. Výskyt plodnic hub a faktory prostředí

Pro každou lokalitu byl testován vliv roku, průměrných hodnot teploty vzduchu, srážek a obsahu dusičnanů (NO_3^-) a rozpustného reaktivního fosforu (PO_4^{3-}) v půdě ve vegetační sezóně na růst plodnic hub. Vzhledem k tomu, že ale žádný z testů nevyšel průkazně, nejsou tyto výsledky prezentovány v této kapitole, ale v jsou uvedeny v kapitole Přílohy (obr. 1 a 2)

II. SEKVENCE ECM HUB V PŮDĚ

Celkem bylo sekvenací půdy získáno 820 OTUs hub, z čehož 162 bylo mykorhizních a reprezentovalo 33 známých druhů. Soubor pomocí sekvenace identifikovaných druhů ECM hub se značně lišil od druhů, které byly v místech odběru zaznamenány pomocí plodnic, a rovněž se značně lišily počty zachycených druhů mezi lokalitami (Tab. 5 a Přílohy Tab. 5).

Tab. 5: Porovnání počtu druhů ECM hub získaných pomocí pozorování plodnic a OTUs získaných sekvenací půdních vzorků z jednotlivých lokalit z roku 2018.

	Počet druhů plodnice	Počet druhů (OTUs) půdy	Společné pro plodnice i OTUs	Celkový počet druhů
PJP	15	25	5	36
PJJ	16	18	4	30
CJH	4	5	0	9
CJD	22	2	0	24

Počet ECM druhů zjištěných pomocí sekvencí na plochách u Plešného jezera byl vyšší než počet druhů zjištěných pouze pomocí plodnic, ale u sekvencí DNA nelze jednoznačně určit, zda zachycené druhy aktivně fungují, či se jedná o neaktivní, ale konzervovanou DNA (neklíčící spóry, reziduální DNA, která nepodlehla degradaci aj.). Na ploše CJD naopak pozorování plodnic zachytilo výrazně vyšší množství druhů (22) než sekvence z půdy (2) a na ploše CJH byl nízký počet druhů jak v případě plodnic (4), tak v případě DNA sekvencí (5). Není znám důvod, proč byl na plochách u Čertova jezera zachycen tak nízký počet ECM druhů hub pomocí sekvencí, ačkoliv odběry vzorků a nakládání s nimi, i amplifikace DNA a počet readů na vzorek proběhly u všech ploch stejným způsobem (cca 4 000 – 20 000 readů na vzorek). U ploch u Čertova jezera ale došlo k velmi vysoké amplifikaci rodu *Oidiodendron*, který tvoří erikoidní mykorhizu.

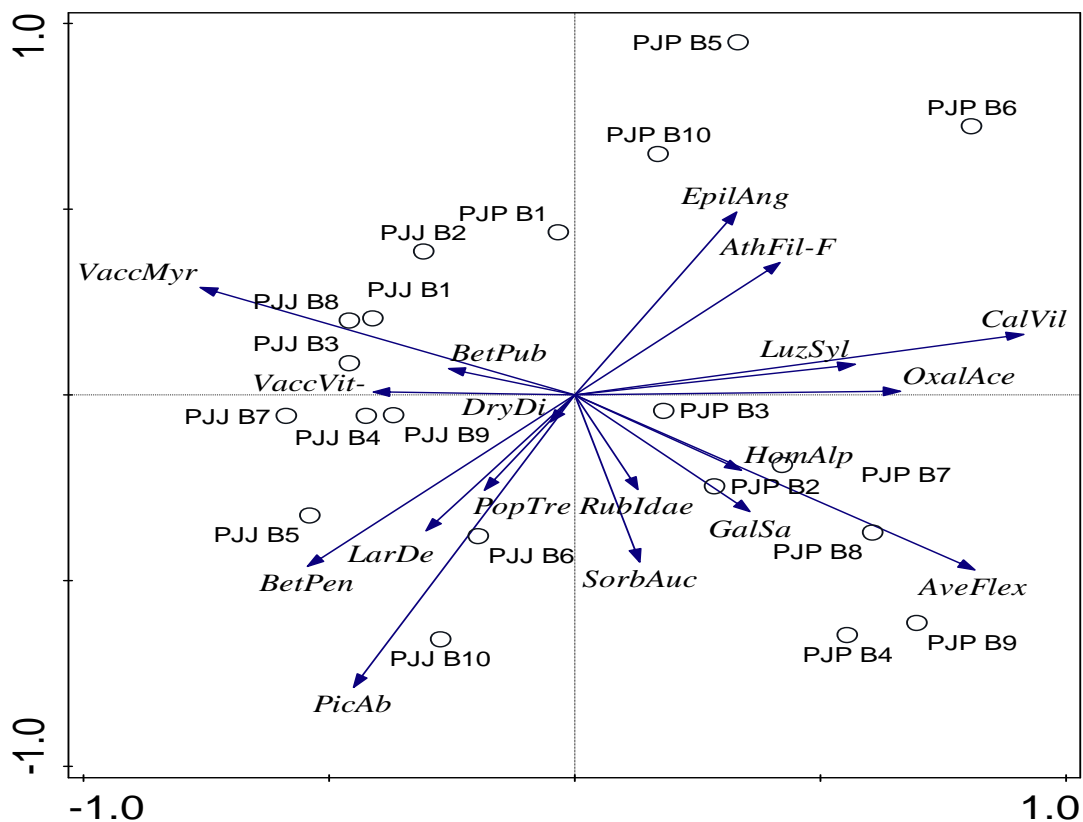
Porovnáním získaných sekvencí DNA z roku 2018 s plodnicemi získanými v průběhu celého monitoringu se ukazuje, že i v tomto případě je mezi těmito daty velmi malý překryv, a to pouze o druhy *Hygrophorus olivaceoalbus* a *Cortinarius flexipes* na obou plochách u Plešného jezera.

Příkladem rozdílu plodnic a molekulárních dat může být *Cortinarius bataillei*, který se na obou plochách u Plešného jezera nacházel v roce 2018 celkově ve vysokých počtech (225 plodnic na ploše PJP, respektive 250 na ploše PJJ) a jeho nálezy byly zaznamenány rovnoměrně ve všech procházených pásech. I přesto ale nebyl zaznamenán pomocí sekvencí. Stejná situace nastala u druhů ryzec *Lactarius rufus* a *Paxillus involutus* na ploše PJJ.

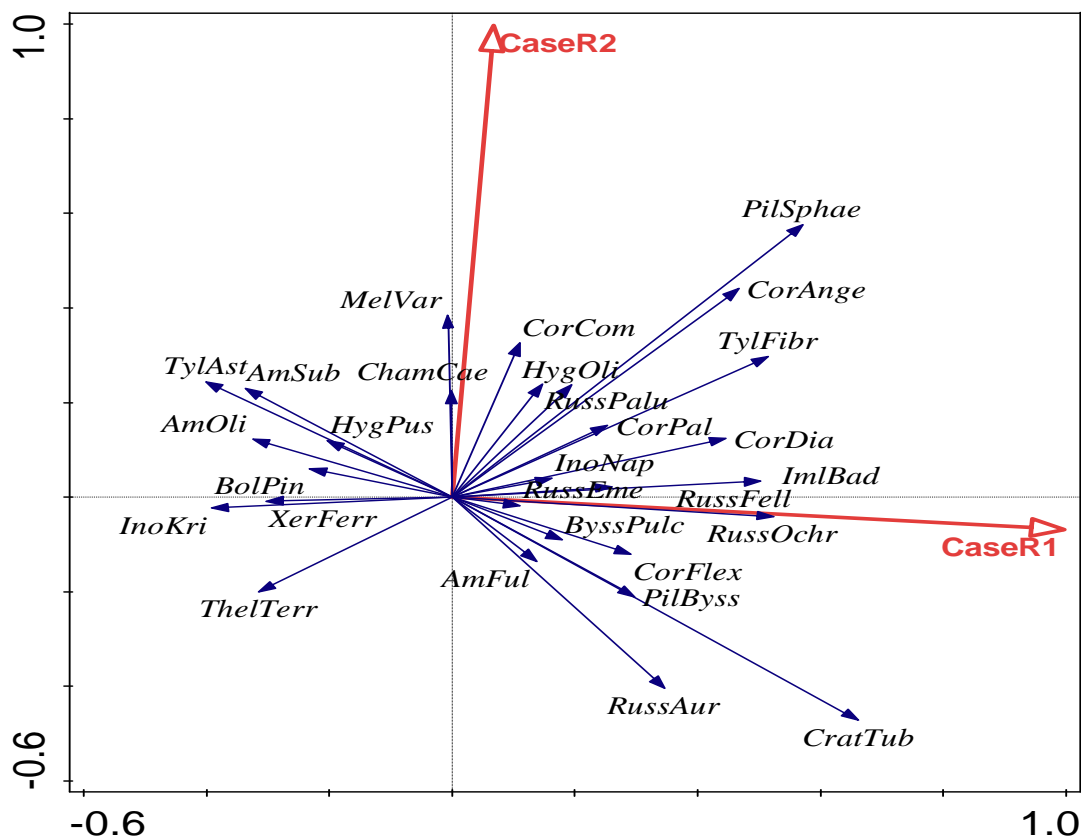
III. VLIV VEGETACE NA VÝSKYT DNA ECM HUB

Vzhledem k tomu, že u ploch u Čertova jezera nedošlo k téměř žádné amplifikaci DNA ektomykorhizních hub, byl vliv vegetace testován pouze u ploch u Plešného jezera. Na obr. 5 je vidět, že plochy PJJ a PJP se rozdělily na základě gradientu vegetace zhruba v rovině horizontální osy, který je tvořen mírou pokryvnosti brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus*) a brusnice brusinky (*Vaccinium vitis-idaea*) (0,-1) a mírou pokryvnosti trav třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa*) a metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*) (0,1). Druhý gradient, který vytváří zhruba vertikální osa, je tvořen otevřenějším prostorem, kde se vyskytuje vrbovka úzkolistá (*Epilobium angustifolium*) či papratka samičí (*Athyrium filix-femina*) (0,1), a prostorem zarůstajícím dřevinami (*Picea abies*, *Sorbus aucuparia*, *Betula pendula* aj.).

Pokud jsou výše zmíněné gradienty z analýzy PCA vyneseny jako faktory pro analýzu společenstva hub (obr. 6), větší množství ECM hub se vyskytuje v prostoru představující otevřenější a spíše travnatá místa. Výsledek analýzy ukazuje, že CaseR1 průkazně (pseudo-F=4,7, Padj=0,004) vysvětluje 20,6 % variability a Case R2 na hranici průkaznosti (pseudo-F=2,0, Padj=0,058) vysvětluje 8,5 % variability.



Obr. 5: Shrnutí variability v rostlinném společenstvu pomocí neomezené ordinace metodou PCA v závislosti na plošce, kdy první osa vysvětluje 48,13 % variability a druhá osa 19,51 %. *Avenella flexuosa* (AveFlex), *Athyrium filix-femina* (AthFil-F), *Betula pendula* (BetPen), *Betula pubescens* (BetPub), *Calamagrostis villosa* (CalVil), *Dryopteris dilatata* (DryDi), *Epilobium angustifolium* (EpilAng), *Galium saxatile* (GalSa), *Homogyne alpina* (HomAlp), *Larix decidua* (LarDe), *Luzula sylvatica* (LuzSyl), *Oxalis acetosella* (OxalAce), *Picea abies* (PicAb), *Populus tremula* (PopTre), *Rubus idaeus* (RubIdae), *Sorbus aucuparia* (SorbAuc), *Vaccinium myrtillus* (VaccMyr), *Vaccinium vitis-idaea* (VaccVit).



Obr. 6: Analýza společenstva hub metodou Interactive Forward Selection, kde byly jako prediktory vybírány hodnoty předchozí analýzy PCA určující polohu plošek (PJJ/PJP B1-10) analýze variability vegetace, jinými slovy horizontální gradient borůvka-traviny (CaseR1) a vertikální gradient otevřený prostor-pokryvnost stromů (Case R2). *Amanita fulva* (AmFul), *Amanita olivaceogrisea* (AmOli), *Amanita submembranacea* (AmSub), *Boletus pinophilus* (BolPin), *Byssocorticium pulchrum* (ByssPulch), *Cortinarius angelesianus* (CorAnge), *Cortinarius comptulus* (CorCom), *Cortinarius diasemospermus* (CorDia), *Cortinarius flexipes* (CorFlex), *Cortinarius paleifer* (CorPal), *Craterellus tubaeformis* (CratTub), *Hygrophorus olivaceoalbus* (HygOli), *Hygrophorus pustulatus* (HygPus), *Chamonixia caespitosa* (ChamCae), *Imleria badia* (ImlBad), *Inocybe krieglsteineri* (InoKri), *Inocybe napipes* (InoNap), *Meliniomyces variabilis* (MelVar), *Piloderma byssinum* (PilByss), *Piloderma sphaerosporum* (PilSphae), *Russula aurora* (RussAur), *Russula emetica* (RussEme), *Russula fellea* (RussFell), *Russula ochroleuca* (RussOchr), *Russula paludosa* (RussPalu), *Thelephora terrestris* (TheiTerr), *Tylospora asterophora* (TylAst), *Tylospora fibrillosa* (TylFibr), *Xerocomus ferrugineus* (XerFerr).

5. DISKUZE

I. PLODNICE

Smrčiny na územích povodí Plešného a u Čertova jezera byly recentně postiženy velkoplošnými disturbancemi. Disturbance však měly odlišný mechanismus průběhu, který do značné míry ovlivňuje podmínky pro následný vývoj společenstva ECM hub. Zatímco rozpad porostu v povodí Plešného jezera (plochy PJJ a PJP) způsobil převážně kůrovcový žír, plocha CJH v povodí Čertova jezera byla na podzim roku 2017 zasažena větrným polomem. Vichřice a kůrovec mnohdy ovlivňují horské smrčiny společně (Čada et al., 2016), ale působení těchto disturbančních činitelů jednotlivě je značně odlišné a pro vývoj daného ekosystému hraje roli, v jakém pořadí budou působit. Žír kůrovce působí pomaleji a rozpad stromového patra je tak pozvolnější (měsíce, roky). Celý ekosystém tak může na dané změny postupně reagovat a již v průběhu rozpadu porostu se připravovat k obnově. Při gradaci kůrovce navíc zpravidla dochází k usychání stromů nastojato, takže při následné vichřici dochází spíše ke zlomům uschlých kmenů a nebývá tolik narušen půdní profil. Oproti tomu vichřice je disturbanční činitel, který působí jednorázově (minuty, hodiny), a tak pokud je hlavní příčinou plošného rozpadu stromového patra, ekosystém se na změny nemůže předem připravit a záleží na adaptačních schopnostech jednotlivých organismů k rychlým změnám. Zároveň při působení vichřic na živý porost dochází velmi často k vývrátům celých stromů i s kořenovým systémem, a tedy k narušení půdy a k obnažení místa samotného symbiotického vztahu. Vyvrácené živé stromy postupně odumírají a zároveň se po dobu svého usychání stávají snadným zdrojem k namnožení kůrovce.

Na území povodí Plešného jezera došlo v důsledku kůrovcového žíru v letech 2004 – 2008 k plošnému odumření stromového patra (Kaňa et al., 2013) a následně po měsících až letech postupnému lámání a vyvracení souší vlivem větru. Dalo by se předpokládat, že takto zásadní změna ve fungování ekosystému významně zasáhne do společenstva ektomykorhizních hub. Přesto nikdy na plochách PJJ a PJP v průběhu monitoringu nedošlo k úplnému vymizení jejich plodnic. Toto zjištění je částečně v rozporu s výsledky práce Štursová et al. (2014), kdy autoři při opakovaném sekvenování půdní DNA na odlišných plochách poblíž Plešného jezera pozorovali v letech po disturbance významný úbytek, a nakonec i vymizení DNA ektomykorhizních hub.

Zachování ECM hub je na mnou analyzovaných plochách podloženo 8 letým souvislým monitoringem plodnic započatým ihned po ukončení působení disturbančních činitelů, a

jednorázovým monitoringem v roce 2018, tedy po 11 letech od poslední disturbance. Tento mechanismus odumření stromového patra, kdy dospělé smrky nejprve uschnou a až poté postupně padají působením větru, by pro přežívání ECM mohl přinášet určité výhody. Již před úplným odumřením stromového patra byly v bylinném a keřovém patře přítomny semenáčky, které s velkou pravděpodobností tvořily ektomykorhizní symbiózu a které byly připraveny pro obnovu po rozpadu stromového patra. Na druhou stranu, množství zmlazujících semenáčků bylo zejména na ploše PJP poměrně nízké (Matějka, 2018), a tak lze do určité míry předpokládat také schopnost některých ECM hub přežít bez symbiotického partnera. Nelze ovšem opomenout ani to, že ačkoliv působení disturbancí na stromové patro bylo plošné, některým jednotlivým stromům se podařilo přežít působení kůrovce i větru, a ty se nyní stávají důležitým zdrojem jak v přenosu své genetické informace, tak jako zdroj na nich přeživších ECM symbiontů (Sterkenburg et al., 2019). Při studiu společenstva hub smrčin na plochách poškozených kůrovcem v Tatrách pomocí sekvenování houbové DNA bylo zjištěno, že plocha, na které bylo zhruba 10 % odumření stromového patra po napadení kůrovcem, se relativním zastoupením sekvencí nelišila od referenčního nepoškozeného lesa. Naopak plocha, kde došlo k úplnému odumření stromového patra kůrovcem a záznamem vegetace byl zjištěn nízký počet zmlazujících semenáčků, měla výrazně snížený počet ECM druhů a dominovaly stres tolerantní druhy (zde *Piloderma olivaceum*, *Inocybe soluta*, *Wilcoxina* sp., *T. terrestris*, *Tylospora asterophora*) (Veselá et al., 2019).

V případě plochy CJH byl mechanismus disturbance odlišný, protože hlavní příčinou rozpadu stromového patra bylo pouze působení orkánu Herwart na koni října 2017. Znalost o plodnicích ECM hub na této ploše je pouze v jedné sezóně po disturbanci, kdy lze konstatovat pouze výrazný úbytek vzhledem ke složení společenstva před disturbancí. Mezi přeživší druhy nalezené pomocí plodnic patřily *Cortinarius tenuifulvescens*, *Cortinarius bataillei* a *Xerocomus badius*, přičemž poslední dva zmíněné druhy patřily i na ostatních sledovaných plochách mezi druhy nacházené po disturbancích. Egli et al. (2002) studovali vliv větrné disturbance na společenstvo ECM druhů po 10 letech, kde na ploše 10 x 10 m nebyl žádný semenáč z doby před disturbancí a nejbližší dospělý les byl vzdálen více než 100 m. Pomocí bioaktivního testu půdy (bioassay), ektomykorhizních morfotypů a molekulární metody RFLP bylo zjištěno, že ačkoliv po disturbanci došlo ke značné redukci ECM druhů i po 10 letech se v půdě vyskytovaly ECM houby schopné kolonizovat kořínky semenáčů. U plochy CJH je díky záznamu vegetace z roku 2018 je známo,

že na dané ploše se, i když v nižších pokryvnostech, vyskytovaly vzrostlé semenáče smrku, které zde musely růst již před rozpadem stromového patra, a dá se u nich předpokládat rozvinutá ECM symbióza. To by mohlo v budoucnu hrát na dané lokalitě důležitou roli v obnově stromového patra i ECM symbiózy (Peay et al., 2011, Sterkenburg et al., 2019). Oproti plochám u Plešného jezera (PJP, PJJ) byl pokles počtu plodnic na ploše CJH snížen ihned nejbližší sezónu po disturbance. Tento výsledek ale nelze interpretovat pouze jako vliv disturbance, protože nelze odfiltrout vliv počasí, a rok 2018 byl pro tvorbu plodnic na studovaných plochách velmi nepříznivý. To lze ilustrovat na druhé ploše u Čertova jezera (CJD), která nebyla po celou dobu monitoringu narušena plošnou disturbance, a kde byl výskyt plodnic i počtu druhů ektomykorhizních hub v roce 2018 rovněž významně snížen (na dané ploše se jedná o rok s druhými nejnižšími počty plodnic i druhů).

V rámci každé plochy byly v závislosti na disturbančních faktorech a na základě času a frekvence výskytu plodnic vytvořeny specifické kategorie hub. Při vzájemném porovnání těchto kategorií mezi všemi sledovanými plochami byla u některých druhů zaznamenána podobná reakce na stav lesa a disturbance.

Z 9 monitorovaných let byl alespoň v 5 letech na všech monitorovaných plochách pozorován *Cortinarius bataillei*. Obecně se alespoň u části druhů rodu *Cortinarius* předpokládá významná role v degradaci komplexních organických látek, protože bylo zjištěno, že vysoké zastoupení tohoto rodu koreluje s vysokým zastoupením enzymů Mn-peroxidázy. Tyto enzymy, jinak typické pro dřevo rozkládající houby tzv. bílé hniloby, jsou schopné interagovat s fenolickými i s nefenolickými substráty a rozkládat je na jednodušší látky (Bödeker et al., 2014). Schopnost dekompozice ovšem neříká nic o schopnosti využití rozložených uhlíkatých látek. Druh *Cortinarius bataillei* byl rovněž významně zastoupeným druhem v zatím nepublikované práci studující vliv disturbance a různých typů managementu na růst plodnic v Tatrách (Vašutová et al., in prep.). V práci (Senn-Irlet, Bieri, 1999) porovnávající mykobiotu v nedisturbovaném a v mladém smrkovém lese po disturbance byl tento druh shodně nalezen na obou typech stanovišť. Oproti tomu *Cortinarius brunneus* byl druhem, který na všech stanovištích, která prošla disturbance (PJP, PJJ a CJH) vymizel. Dahlberg et al. (2001) při studiu disturbance ohněm a různých typů managementu boreálního lesa našli tento druh pouze na nedisturbovaných plochách. V již zmíněné práci (Senn-Irlet, Bieri, 1999) byl tento druh naopak zaznamenán jak v nedisturbovaném, tak v disturbovaném lese, nicméně tento rozdíl může být dán tím, že plocha

disturbovaného lesa byla označována jako plocha mladého lesa na základě charakteristiky vzrůstu porostu v horských podmínkách Alp, ačkoliv byla již 30 let po disturbanci.

Výsledky této práce by mohly naznačovat, že pomalejší disturbance kůrovcem by v porovnání s větrnou disturbancí mohla vytvářet příznivější podmínky pro přežívání ECM hub. Tento výsledek se ale neshoduje např. s prací Vašutová et al. (in prep), kde naopak na ploše po odumření stromového patra kůrovcem bylo nalezeno méně plodnic ECM druhů než na ploše po větrné disturbanci. Lze tedy předpokládat, že kromě průběhu disturbance bude vývoj ECM společenstva záviset i na průběhu abiotických faktorů (srážky, teplota aj.), na specifických vlastnostech dané lokality a na množství poškozených, respektive nepoškozených stromů.

Na obou plochách u Plešného jezera byly po disturbanci nově zaznamenány druhy *Laccaria proxima* a *Thelephora terrestris*, což jsou houby typické pro mladá stadia lesa (Mason et al., 1983), které jsou zřejmě adaptované na disturbance ekosystému (Veselá et al., 2019), a zároveň vytvářejí symbiózu s břízou (*Betula pendula*), která je označovaná jako typická raně sukcesní dřevina.

Nesrovnalosti panují ohledně rodu *Russula*. Zatímco Štursová et al. (2014) na základě pomalejšího úbytku sekvencí v půdě a znalostech o enzymatické výbavě, předpokládají schopnost rodu *Russula* přežít pomocí saprotrofní výživy a potvrzují to i naše údaje, v Tatrách došlo k vymizení plodnic holubinek na kalamitních plochách (Veselá et al., 2019). Pravděpodobně je důvodem odlišná ekologie druhů v rámci rodu. Na Šumavě se jednalo o druh *R. ochroleuca* a *R. emetica*, kdežto v Tatrách o druhy *Russula mustelina*, *Russula puelaris* a *Russula vesca* (Veselá et al., 2019). Gebauer a Taylor (1999) v rámci hub se saprotrofní a ektomykorhizní životní formou identifikovali 4 skupiny v závislosti na jejich schopnosti využívat dusík ze třech hlavních zdrojů – dusík vázaný v půdní organické hmotě, anorganické formy dusíku v půdě a dusík vázaný v komplexnějších sloučeninách opadu a v odumřelém dřevu. V rámci ektomykorhizních hub byly vymezeny 2 skupiny – i) ECM houby, u kterých je známá závislost na anorganických formách dusíku (např. rod *Laccaria*,) a ii) ECM houby schopné využívat organické formy dusíku, mezi které je řazena právě *Russula ochroleuca*, ale také některé druhy rodu *Cortinarius*. Odlišnost ve využívání zdrojů dusíku by mohla být jedním z faktorů ovlivňující reakci jednotlivých druhů na disturbanci a na proces sekundární sukcese.

II. SEKVENCE ECM HUB V PŮDĚ

Při porovnání dat o plodnicích ECM hub z roku 2018 se sekvencemi DNA získanými z půdních vzorků byl zjištěn velmi nízký počet druhů, který byl zachycen oběma metodami současně. V případě plochy PJP se jednalo o 5 druhů (*Russula emetica*, *Russula ochroleuca*, *Thelephora terrestris*, *Tylospora asterophora*, *Tylospora fibrillosa*) a v případě plochy PJJ o 3 druhy (*Russula ochroleuca*, *Thelephora terrestris*, *Tylospora fibrillosa*) 1 rod (*Tomentella sp.*). Tyto výsledky jsou ve shodě s dalšími pracemi využívajícími molekulární metody ke studiu společenstev ECM hub (Horton, Bruns, 2001; Vašutová et al., 2018; Veselá et al., 2019). Čeleď *Russulaceae* a houby z řádu *Atheliales* jsou z ne úplně zřejmých důvodů pomocí těchto metod zaznamenávány jako nejpočetnější. Neshoda mezi plodnicemi a sekvencemi DNA z půdy může být způsobena několika důvody – i) vytváření plodnic ECM hub není zcela objasněným a pravidelným jevem a je do značné míry závislé na environmentálních faktorech prostředí, ii) rozmístění mycelia v půdě je nerovnoměrné a navíc jsou u jednotlivých druhů rozdíly v délce a hustotě mimokořenového mycelia (expolarční typy), iii) při odběru půdních vzorků bylo zohledněno, že část ploch se nachází v bezzásahových zónách NP, a tak bylo odebíráno pouze nejnutnější množství půdy. Na plochách PJP a PJJ byl pomocí plodnic rovnoměrně po celé ploše zaznamenán druh *Cortinarius bataillei*, a přesto nebyl zaznamenán pomocí sekvencí DNA z půdy. V práci (Horton, Bruns, 2001). porovnávající plodnice s ektomykorhizními špičkami byly rovnoměrně zaznamenány plodnice rodu *Cortinarius*, a přesto byl tento rod na kořincích zaznamenán minimálně. Z těchto výsledků se tedy zdá, že pokud chceme získat realitě blízký pohled na ECM společenstvo je nutné použít kombinaci více metod.

Na plochách u Čertova jezera došlo z neznámých důvodů k zachycení velmi malého počtu readů ECM hub a jako dominantní byl naamplifikován rod *Oidiodendron* tvořící erikoidní mykorhizu.

III. VLIV VEGETACE NA VÝSKYT DNA EKTOMYKORHIZNÍCH HUB

Výsledek testování vlivu vegetace na přítomnost ECM hub v půdě ukázal, že sekvence ECM hub jsou více zastoupeny v místech s nižší a volnější vegetací tvořenou spíše travami než borůvkou. K velmi podobným výsledkům za použití menších ploch (2 x 2 m) dospěl ve své práci i Sástad (1995), který zkoumal vliv vegetace podrostu boreálního lesa na výskyt plodnic hub. Jedním z rozdílů mezi výše zmíněnými typy vegetace je, že trávy (zde *Avenella flexuosa* a *Calamagrostis villosa*) vytvářejí arbuskulární mykorhizu, kdežto borůvka (*Vaccinium myrtillus*) vytváří mykorhizu erikoidní. Obecně je pro mykorhizní skupiny hub zásadní získávání dusíku nejen pro svou vlastní potřebu, která je u hub na jednotku biomasy vyšší než u vyšších rostlin (Gebauer, Dietrich, 1993), ale zejména pro výměnu se symbiotickými rostlinami za uhlíkaté sloučeniny. Na rozdíl od hub arbuskulární mykorhizy mají ale houby erikoidní mykorhizy částečně zachované enzymy, díky nimž jsou schopné zpřístupnit dusík ze složitějších organických látek. K částečnému zachování těchto enzymů dochází ale i u ECM hub, a vzhledem k podobnosti ve složení biomasy hub i rostlin vytvářejících erikoidní nebo ECM symbiózu se předpokládá i využívání podobných zdrojů dusíku (Hobbie, E. A., Hobbie, J. E. 2008). Na základě těchto poznatků by se dalo předpokládat, že zjištění vyššího zastoupení sekvencí ektomykorhizních hub ve volném prostoru s travinami je způsobeno vyhledáváním zdrojů dusíku, které jsou vázány v komplexnějších organických sloučeninách, ale o které s arbuskulárními houbami na rozdíl od hub erikoidních nemusí kompetovat .

6. ZÁVĚR

Dlouhodobým monitoringem plodnic bylo zjištěno, že na disturbovaných plochách byly snižené počty druhů i plodnic ektomykorhizních hub oproti plochám nedisturbovaným, nicméně po žádné z disturbancí nikdy nedošlo k jejich úplnému vymizení. Zároveň bylo zjištěno, že některé druhy, které se objevovaly i po disturbanci, jsou pro některé plochy společné (*Russula ochroleuca*, *Cortinarius bataillei*, *Xerocomus badius*), a že by se tedy nemuselo jednat o náhodný jev, ale potenciální odolnost daných druhů. Na plochách u Plešného jezera, které byly v roce 2018 zhruba 10 až 11 let po disturbanci, se dle posledních let monitoringu zdá, že dochází k postupné obnově ECM společenstva a vyskytují se zde jak houby označované jako typické pro mladá a disturbovaná stanoviště (např. *Thelephora terrestris*, *Laccaria sp.*), tak druhy pozdějších stádií lesa (např. *Cortinarius sp.*).

Na plochách u Plešného jezera byly ECM houby zaznamenané pomocí sekvencí DNA z půdy odlišné od hub zaznamenaných pomocí plodnic, a tak se zdá, že pro zachycení větší části celkového ECM společenstva je vhodná kombinace obou metod.

Při testování vlivu vegetace podrostu bylo zjištěno, že větší výskyt sekvencí DNA ECM hub v půdě byl zjištěn v místech s řídkou a spíše travnatou vegetací, než v místech s výskytem borůvky (*Vaccinium myrtillus*). Důvody tohoto jevu nejsou známy, nicméně jednou z hypotéz je vyhledávání vhodných zdrojů živin (zejména dusíku) v místech, kde je menší kompetiční tlak jiných mykorhizních hub.

CITACE:

- Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae [Online]. *Mycorrhiza*, 11(2), 107-114. <https://doi.org/10.1007/s005720100108>
- Baier, P., Führer, E., Kirisits, T., & Rosner, S. (2002). Defence reactions of Norway spruce against bark beetles and the associated fungus *Ceratocystis polonica* in secondary pure and mixed species stands [Online]. *Forest Ecology And Management*, 159(1-2), 73-86. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00711-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00711-3)
- Beker, HJ; Eberhardt, U; Vesterholt, J. 2016. Hebeloma (Fr.) P. Kumm. Fungi Europaei. 14:1-1218
- Bernicchia, A., & Gorjón, S. P. (2010). *Corticaceae s.l.* Italia: Candusso
- Bödeker, I. T. M., Clemmensen, K. E., de Boer, W., Martin, F., Olson, Å., & Lindahl, B. D. (2014). Ectomycorrhizal Cortinari species participate in enzymatic oxidation of humus in northern forest ecosystems [Online]. *New Phytologist*, 203(1), 245-256. <https://doi.org/10.1111/nph.12791>
- Brandrud T. E., Lindström H., Marklund H., Melot J., Muskos S. (1990-1998): Cortinarius Flora Photographica. Volume 1-5. – Härnösand,
- Bruns, T. D. (2002). Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do the Exceptions Tell Us? [Online]. *Integrative And Comparative Biology*, 42(2), 352-359. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.352>
- Čada, V., Morrissey, R. C., Michalová, Z., Bače, R., Janda, P., & Svoboda, M. (2016). Frequent severe natural disturbances and non-equilibrium landscape dynamics shaped the mountain spruce forest in central Europe [Online]. *Forest Ecology And Management*, 363, 169-178. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.12.023>
- Čada, V., Svoboda, M., & Janda, P. (2013). Dendrochronological reconstruction of the disturbance history and past development of the mountain Norway spruce in the Bohemian Forest, central Europe [Online]. *Forest Ecology And Management*, 295, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.12.037>
- Čížková P, Svoboda M, Křenová Z (2011) Natural regeneration of acidophilous spruce mountain forests in non-intervention management areas of the Šumava National Park—the first results of the biomonitoring project. *Silva Gabreta* 17:19–35.
- Chalupa, T. Loužek, M. (Ed.). (2011). *Kůrovcová kalamita: více než spor přírodovědců : sborník textů*. Praha: CEP - Centrum pro ekonomiku a politiku.
- Chytrý, M. (2010). *Katalog biotopů České republiky: Habitat catalogue of the Czech Republic* (2. vyd). Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.

- Clémentçon H. (2009) Methods for working with macrofungi: laboratory cultivation and preparation of larger fungi for light microscopy, IHW-Verlag.
- Courty, P. -E., Bréda, 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 [Online]. *Soil Biology And Biochemistry*, 39(7), 1655-1663. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.017>
- Courty, P. -E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., et al. (2010). The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts [Online]. *Soil Biology And Biochemistry*, 42(5), 679-698. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.006>
- Dahlberg, A., Schimmel, J., Taylor, A. F. S., & Johannesson, H. (2001). Post-fire legacy of ectomycorrhizal fungal communities in the Swedish boreal forest in relation to fire severity and logging intensity [Online]. *Biological Conservation*, 100(2), 151-161. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00230-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00230-5)
- Dickinson, G., & Murphy, K. J. (2007). *Ecosystems* (2nd ed). New York: Routledge.
- Egli, S., Peter, M., & Falcato, S. (2002). Dynamics of ectomycorrhizal fungi after windthrow. *Forest Snow And Landscape Research*, 77(1-2), 81-88.
- Erbilgin, N., Krokene, P., Christiansen, E., Zeneli, G., & Gershenson, J. (2006). Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces host colonization by the bark beetle *Ips typographus* [Online]. *Oecologia*, 148(3), 426-436. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0394-3>
- Fajardo López, M., Dietz, S., Grunze, N., Bloschies, J., Weiß, M., & Nehls, U. (2008). The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil-growing hyphae [Online]. *New Phytologist*, 180(2), 365-378. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02539.x>
- Gebauer, G., & Dietrich, P. (2006). Nitrogen Isotope Ratios in Different Compartments of a Mixed Stand of Spruce, Larch and Beech Trees and of Understorey Vegetation Including Fungi [Online]. *Isotopenpraxis Isotopes In Environmental And Health Studies*, 29(1-2), 35-44. <https://doi.org/10.1080/10256019308046133>
- Gebauer, G., & Taylor, A. F. S. (1999). ^{15}N natural abundance in fruit bodies of different functional groups of fungi in relation to substrate utilization [Online]. *New Phytologist*, 142(1), 93-101. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00373.x>
- Hais, M., & Kučera, T. (2008). Surface temperature change of spruce forest as a result of bark beetle attack: remote sensing and GIS approach [Online]. *European Journal Of Forest Research*, 127(4), 327-336. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0208-8>

Hartmann, M., Niklaus, P. A., Zimmermann, S., Schmutz, S., Kremer, J., Abarenkov, K., et al. (2014). Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction [Online]. *The Isme Journal*, 8(1), 226-244. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.141>

Heurich M. (2009). Progress of forest regeneration after a large-scale Ips typographus outbreak in the subalpine Picea abies forests of the Bavarian Forest National Park. *Silva Gabreta* 15, 49–66.

Hlásny, T., Zajíčková, L., Turčáni, M., Holuša, J., & Sitková, Z. (2011). Geographical variability of spruce bark beetle development under climate change in the Czech Republic [Online]. *Journal Of Forest Science*, 57(6), 242-249. <https://doi.org/10.17221/104/2010-JFS>

Hobbie, E. A., & Hobbie, J. E. (2008). Natural Abundance of ¹⁵N in Nitrogen-Limited Forests and Tundra Can Estimate Nitrogen Cycling Through Mycorrhizal Fungi: A Review [Online]. *Ecosystems*, 11(5), 815-830. <https://doi.org/10.1007/s10021-008-9159-7>

Högberg, P., Bhupinderpal-Singh, Löfvenius, M. O., & Nordgren, A. (2009). Partitioning of soil respiration into its autotrophic and heterotrophic components by means of tree-girdling in old boreal spruce forest [Online]. *Forest Ecology And Management*, 257(8), 1764-1767. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.01.036>

Horton, T. R., & Bruns, T. D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box [Online]. *Molecular Ecology*, 10(8), 1855-1871. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x>

Hubený P. (2019) Základní přehled managementových opatření v jednotlivých zónách ochrany přírody (návrh nových zón NP Šumava, duben 2019)[online]. Dostupné na: <http://www.npsumava.cz/gallery/39/11998-mangementyzon2019webb.pdf> (4.12.2019).

Hubený P. (2019b) Popis segmentů jednotlivých zón [online]. Dostupné na: <http://www.npsumava.cz/cz/5894/sekce/nova-zonace-narodniho-parku-sumava/>, odkaz Popis segment jednotlivých zón (10.12.2019).

Hubený P., Čížková P. (2010) Věková struktura lesů Šumavy, Zátoň. Dostupné z: <http://www.npsumava.cz/gallery/10/3132-vekovastrukturalesa.pdf> (11.11.2019)

Janda, P., Svoboda, M., Bače, R., Čada, V., & Peck, J. L. E. (2014). Three hundred years of spatio-temporal development in a primary mountain Norway spruce stand in the Bohemian Forest, central Europe [Online]. *Forest Ecology And Management*, 330, 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.06.041>

Janda, P., Trotsiuk, V., Mikoláš, M., Bače, R., Nagel, T. A., Seidl, R., et al. (2017). The historical disturbance regime of mountain Norway spruce forests in the Western Carpathians and its influence on current forest structure and composition [Online]. *Forest Ecology And Management*, 388, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.08.014>

- Jonášová, M., & Prach, K. (2004). Central-European mountain spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) forests: regeneration of tree species after a bark beetle outbreak [Online]. *Ecological Engineering*, 23(1), 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2004.06.010>
- Jonášová, M., Vávrová, E., & Cudlín, P. (2010). Western Carpathian mountain spruce forest after a windthrow: Natural regeneration in cleared and uncleared areas [Online]. *Forest Ecology And Management*, 259(6), 1127-1134. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.12.027>
- Kaňa, J., Tahovská, K., & Kopáček, J. (2013). Response of soil chemistry to forest dieback after bark beetle infestation [Online]. *Biogeochemistry*, 113(1-3), 369-383. <https://doi.org/10.1007/s10533-012-9765-5>
- Khasa, D., Piché, Y., & Coughlan, A. P. (2009). *Advances in mycorrhizal science and technology*. Ottawa: NRC Research Press.
- Kjučukov, P. (2019). Horské smrčiny národního parku Šumava ve faktech. *Lesnická Práce: Časopis Pro Lesnicko-Dřevařskou Vědu A Praxi*, 98(3), 20-23.
- Knudsen H. & Vesterholt J. (2012) Funga Nordica, Nordsvap DK-1123 Copenhagen, Denmark.
- Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L. G., Morin, E., Barry, K. W., Buscot, F., et al. (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists [Online]. *Nature Genetics*, 47(4), 410-415. <https://doi.org/10.1038/ng.3223>
- Kopáček, J., Kaňa, J., Šantrůčková, H., Porcal, P., Hejzlar, J., Pícek, T., Šimek, M., Veselý, J., (2002b) Physical, chemical, and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian Forest lakes II. Čertovo and Černé Lakes, *Silva Gabreta* 8, 67 - 94.
- Kula E. (2014) Ochrana lesa ve středoevropských podmínkách, 1. část Lýkožrout smrkový (*Ips typographus* L.) kalamitní škůdce smrkových ekosystémů střední Evropy, Brno. Dostupné z: https://akela.mendelu.cz/~xcepl/inobio/skripta/Ochrana_lesa.pdf
- Lindahl, B. D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S. E., Högberg, P., Stenlid, J., & Finlay, R. D. (2007). Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest [Online]. *New Phytologist*, 173(3), 611-620. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01936.x>
- Marks, G. C., & Kozlowski, T. T. (1973). *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. New York: Academic Press.
- Mason, P. A., Wilson, J., Last, F. T., & Walker, C. (1983). The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils [Online]. *Plant And Soil*, 71(1-3), 247-256. <https://doi.org/10.1007/BF02182659>
- Matějka K. (2018) Vegetace v povodí Plešného a Čertova jezera v období 2007 až 2018. Publikováno na: <http://www.infodatasys.cz/> (citace 4.12. 2019).

- Nehls, U., Göhringer, F., Wittulsky, S., & Dietz, S. (2010). Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review [Online]. *Plant Biology*, 12(2), 292-301. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x>
- Niemelä, J. (1999). Management in relation to disturbance in the boreal forest [Online]. *Forest Ecology And Management*, 115(2-3), 127-134. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(98\)00393-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(98)00393-4)
- Nováková, M. H., & Edwards-Jonášová, M. (2015). Restoration of Central-European mountain Norway spruce forest 15 years after natural and anthropogenic disturbance [Online]. *Forest Ecology And Management*, 344, 120-130. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.02.010>
- Paine R. T. (2019) Ecological disturbance, Encyclopædia Britannica, inc. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/ecological-disturbance> (9.12.2019)
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. (2011). Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? [Online]. *Fungal Ecology*, 4(3), 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.09.010>
- Pec, G. J., Karst, J., Taylor, D. L., Cigan, P. W., Erbilgin, N., Cooke, J. E. K., et al. (2017). Change in soil fungal community structure driven by a decline in ectomycorrhizal fungi following a mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) outbreak [Online]. *New Phytologist*, 213(2), 864-873. <https://doi.org/10.1111/nph.14195>
- Rinaldi, A. C., Comandini, O., & Kuyper, T. W. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33, 1-45.
- Šamonil, P., Král, K., & Hort, L. (2010). The role of tree uprooting in soil formation: A critical literature review [Online]. *Geoderma*, 157(3-4), 65-79. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.03.018>
- Šantrůčková, H., & Vrba, J. (2010). *Co vyprávějí šumavské smrčiny: průvodce lesními ekosystémy Šumavy*. Vimperk: Správa Národního parku a Chráněné krajinné oblasti Šumava.
- Sarnari M. (2005): Monografia illustrata del genere *Russula* in Europa. Tomo secondo. – Trento
- Såstad, S. M. (1995). Fungi-vegetation relationships in a *Pinus sylvestris* forest in central Norway [Online]. *Canadian Journal Of Botany*, 73(6), 807-816. <https://doi.org/10.1139/b95-089>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R., & Tarkka, M. T. (2005). Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria* [Online]. *New Phytologist*, *168*(1), 205-216. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01518.x>

Seidl, R., Müller, J., Hothorn, T., Bässler, C., Heurich, M., Kautz, M., & Kaplan, I. (2016). Small beetle, large-scale drivers: how regional and landscape factors affect outbreaks of the European spruce bark beetle [Online]. *Journal Of Applied Ecology*, *53*(2), 530-540. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12540>

Senn-Irlet, B., & Bieri, G. (1999). Sporocarp succession of soil-inhabiting macrofungi in an autochthonous subalpine Norway spruce forest of Switzerland [Online]. *Forest Ecology And Management*, *124*(2-3), 169-175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(99\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(99)00064-X)

Sterkenburg, E., Clemmensen, K. E., Lindahl, B. D., Dahlberg, A., & Nuñez, M. (2019). The significance of retention trees for survival of ectomycorrhizal fungi in clear-cut Scots pine forests [Online]. *Journal Of Applied Ecology*, *56*(6), 1367-1378. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13363>

Svoboda M., (2012) Problematika managementu lesů v národních parcích – co je nutno změnit a jak? Publikováno na: <https://www.infodatasys.cz/biodivkrsu/svoboda2011.pdf> (citace 4.12. 2019).

Svoboda, M., Fraver, S., Janda, P., Bače, R., & Zenáhlíková, J. (2010). Natural development and regeneration of a Central European montane spruce forest [Online]. *Forest Ecology And Management*, *260*(5), 707-714. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.05.027>

Taylor, A. N. D. Y. F. S., & Alexander, I. A. N. (2005). The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world [Online]. *Mycologist*, *19*(3), 102-112. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(05\)00303-4](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(05)00303-4)

Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages [Online]. *Mycorrhiza*, *20*(4), 217-263. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>

Treu, R., Karst, J., Randall, M., Pec, G. J., Cigan, P. W., Simard, S. W., et al. (2014). Decline of ectomycorrhizal fungi following a mountain pine beetle epidemic [Online]. *Ecology*, *95*(4), 1096-1103. <https://doi.org/10.1890/13-1233.1>

Vašutová M., Veselá P., Edwards M., Červenka J., Fleischer P. & Cudlín P. (in prep) Vliv disturbancí a managementu na mykorrhizní houby na trvalých plochách v Tatrách

Vašutová, M., Edwards-Jonášová, M., Veselá, P., Effenberková, L., Fleischer, P., & Cudlín, P. (2018). Management regime is the most important factor influencing ectomycorrhizal species community in Norway spruce forests after windthrow [Online]. *Mycorrhiza*, 28(3), 221-233. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0820-5>

Veselá, P., Vašutová, M., Edwards-Jonášová, M., & Cudlín, P. (2019). Soil Fungal Community in Norway Spruce Forests under Bark Beetle Attack [Online]. *Forests*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/f10020109>

White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315 – 322. Academic Press, London

Zahradník P. (2015) Historie kůrovcové kalamity na Šumavě a její možné dopady na budoucí vývoj. Dostupné z: <http://www.npsumava.cz/gallery/31/9433-zahradnik.pdf> (4.12.2019)

PŘÍLOHY

Tab.1 a, b, c, d: Soupis všech druhů v letech monitoringu (2007- 2014, 2018) na plochách PJP, PJJ, CJH a CJD. Puntíkem jsou označené plodnice, u nichž bylo provedeno molekulární určení druhu.

a) Plocha PJP

Název	PIP 2007	PIP 2008	PIP 2009	PIP 2010	PIP 2011	PIP 2012	PIP 2013	PIP 2014	PIP 2018
<i>Cortinarius azureovelatus</i> cf.	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius bataillei</i>	0	0	2	0	9	55	2	124	225
<i>Cortinarius biformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	* 5
<i>Cortinarius brunneus</i> s.l.	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius croceus</i>	0	0	1	0	2	3	0	32	9
<i>Cortinarius epipoleus</i>	0	18	0	8	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flabellus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flexipes</i>	41	0	0	0	0	0	0	24	0
<i>Cortinarius obtusus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Cortinarius semisanguineus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cortinarius sommerfeltii</i>	0	2	0	0	0	0	0	36	0
<i>Cortinarius subtortus</i>	31	0	6	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	* 4
<i>Hebeloma incarnatum</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>Inocybe boltonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>Laccaria laccata</i> s.l.	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Laccaria proxima</i>	0	0	0	0	0	2	0	3	0
<i>Lactarius lignyotus</i>	2	0	0	0	0	0	0	9	0
<i>Lactarius rufus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Lactarius turpis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paxillus involutus</i>	0	0	0	0	0	0	0	8	0
<i>Russula atrorubens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	* 2
<i>Russula emetica</i>	1	0	0	0	1	5	0	4	1
<i>Russula ochroleuca</i>	7	5	36	2	3	15	1	72	3
<i>Telephora terrestris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2
počet ECM druhů	9	3	6	2	4	6	2	12	12
počet ECM plodnic	89	25	47	10	15	81	3	318	262

b) Plocha PJJ

Název	PJJ 2007	PJJ 2008	PJJ 2009	PJJ 2010	PJJ 2011	PJJ 2012	PJJ 2013	PJJ 2014	PJJ 2018
<i>Amanita fulva</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius bataillei</i>	0	0	0	0	4	9	20	46	250
<i>Cortinarius brunneus</i> s.l.	25	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius croceus</i>	0	0	0	0	0	0	0	8	61
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flabellus</i>	24	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flexipes</i>	25	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius gentilis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius lignicolus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius rubellus</i>	3	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Cortinarius scaurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cortinarius semisanguineus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Cortinarius subtortus</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	0	0	1	2	0	0	0	0	0
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Laccaria proxima</i>	0	0	0	0	0	10	1	11	60
<i>Lactarius rufus</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	119
<i>Leccinum brunneogriseolum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	29
<i>Leccinum variicolor</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	32
<i>Paxillus involutus</i>	2	0	1	0	0	1	2	44	124
<i>Russula emetica</i>	5	0	0	0	0	0	0	3	1
<i>Russula fragilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Russula ochroleuca</i>	47	0	13	0	1	0	0	7	6
<i>Suillus grevillei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Telephora terrestris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>Xerocomus badius</i>	2	0	1	0	0	4	1	3	2
<i>Xerocomus ferrugineus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0
počet ECM druhů	13	2	5	1	2	4	4	10	15
počet ECM plodnic	142	2	18	2	5	24	24	125	698

c) Plocha CJH

Název	CJH 2007	CJH 2008	CJH 2009	CJH 2010	CJH 2011	CJH 2012	CJH 2013	CJH 2014	CJH 2018
<i>Amanita submembranacea</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Amanita umbrinolutea</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Cortinarius bataillei</i>	0	7	60	6	25	49	12	85	3
<i>Cortinarius brunneus</i> s.l.	15	0	21	8	8	21	5	103	0
<i>Cortinarius croceoconus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius croceus</i>	0	0	6	0	0	0	0	11	0
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flabellus</i>	0	0	12	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flexipes</i>	4	0	80	0	9	* 101	0	15	0
<i>Cortinarius obtusus</i>	0	0	37	0	0	0	0	21	0
<i>Cortinarius lignicolus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cortinarius sommerfeltii</i>	6	0	0	0	0	2	0	0	0
<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	* 7
<i>Cortinarius tortuosus</i>	0	0	* 5	5	0	1	0	0	0
<i>Elaphomyces granulatus</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	0
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	59	10	21	6	3	10	2	56	0
<i>Inocybe napipes</i>	0	0	1	0	1	2	0	1	0
<i>Laccaria laccata</i> s.l.	0	0	21	0	0	2	10	0	0
<i>Lactarius lignyotus</i>	0	0	8	0	0	1	0	4	0
<i>Lactarius rufus</i>	3	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Lactarius turpis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Russula emetica</i>	0	0	5	0	0	0	0	2	0
<i>Russula helodes</i> cf.	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Russula ochroleuca</i>	15	10	108	0	16	42	2	17	0
<i>Xerocomus badius</i>	13	30	64	0	5	61	10	212	2
počet ECM druhů	7	6	15	4	10	11	6	15	3
počet ECM plodnic	115	59	450	25	72	292	41	532	12

d) Plocha CJD – 2.část

	CID 2007	CID 2008	CID 2009	CID 2010	CID 2011	CID 2012	CID 2013	CID 2014	CID 2018
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	19	66	36	27	6	29	3	85	0
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	0	0	0	1	0	3	0	0	0
<i>Chalciporus piperatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>Inocybe assimilata</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Inocybe napipes</i>	4	42	19	3	1	6	0	16	0
<i>Inocybe soluta</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Laccaria amethystina</i>	2	8	22	7	0	12	0	15	0
<i>Laccaria laccata</i> s.l.	2	3	1	4	0	0	0	1	0
<i>Laccaria proxima</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactarius helvus</i>	16	21	24	7	0	4	0	71	0
<i>Lactarius lignyotus</i>	4	47	40	11	6	14	4	138	0
<i>Lactarius rufus</i>	32	44	23	14	13	9	2	64	13
<i>Lactarius subdulcis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Lactarius tabidus</i>	38	337	118	35	2	11	0	548	27
<i>Lactarius theiogalus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	11
<i>Lactarius turpis</i>	5	4	1	0	0	0	0	7	0
<i>Paxillus involutus</i>	7	5	3	1	3	13	13	15	7
<i>Russula amethystina</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Russula cyanoxantha</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Russula densifolia</i>	0	3	2	0	0	0	0	15	0
<i>Russula emetica</i>	5	3	19	0	4	12	6	8	1
<i>Russula fellea</i>	12	5	53	10	3	25	0	6	0
<i>Russula nigricans</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Russula nobilis</i> cf.	4	33	16	12	0	15	0	7	1
<i>Russula ochroleuca</i>	68	67	228	3	41	329	0	48	0
<i>Russula paludosa</i>	0	0	0	0	0	7	0	8	0
<i>Xerocomus badius</i>	8	37	27	11	7	19	35	177	10
<i>Xerocomus ferrugineus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	0	4	1	0	0	3	0	3	1
<i>Xerocomus pruinatus</i>	9	4	41	5	13	18	6	5	0
počty ECM druhů	32	42	36	33	23	36	17	39	20
pocet ECM plodnic	927	2374	2424	551	836	2301	140	3546	144

Tab. 2: Přehled kornatcovitých hub nalezených na monitorovaných plochách v roce 2018.

ECM KORNATCE 2018	PJP	PJJ	CJD	CJH
<i>Amphinema byssoides</i>	4	2	0	0
<i>Piloderma lyssinum</i>	0	0	1	0
<i>Tylospora asterophora</i>	1	0	0	0
<i>Tylospora fibrilosa</i>	9	1	3	1
<i>Tomentella sp.</i>	0	4	0	0

Tab. 3 a), b), c), d): Vegetační snímky zaznamenané na jednotlivých plochách v roce 2018.

a) PJP

PJP	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
E0	20	40	50	50	30	30	50	10	80	30
E1	40	60	50	50	30	40	60	80	60	40
<i>Avenella flexuosa</i>		+		+		10			1	5
<i>Athyrium filix-femina</i>										+
<i>Betula pendula</i>								+		
<i>Dryopteris dilatata</i>	2	+	1	1	1	+	+	+	+	2
<i>Epilobium angustifolium</i>	r	r	+		r	r		+		
<i>Picea abies</i>		1	1	5		1	+	5	+	+
<i>Rubus idaeus</i>	+	r								1
<i>Vaccinium myrtillus</i>	40	40	40	40	30	30	50	70	60	30
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>		1		1	+		10			+
E2	15	10	20	20	50	20	30	10	20	40
<i>Betula pendula</i>		+	1	1	10	5	5	1	+	10
<i>Betula pubescens</i>		+	1							
<i>Larix decidua</i>					+					
<i>Picea abies</i>	15	1	20	10	40	15	25	5	20	20
<i>Populus tremula</i>					+					
<i>Sorbus aucuparia</i>		5		5	1		+	1	2	10
E3										
Mrtvé stojící dřevo	3	3	Chybí údaj	2	2	4	1	3	2	5
Mrtvé ležící dřevo	11	7	Chybí údaj	7	3	2	5	2	5	10

b) PJJ

PJJ	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
E₀	70	20	25	5	10	15	90	10	5	20
E₁	40	60	50	80	80	90	80	45	80	60
<i>Avenella flexuosa</i>	5	5	5	60	1	5	20	30	70	5
<i>Athyrium filix-femina</i>						15	+			
<i>Calamagrostis villosa</i>		20	10	10	40	70	20	10	15	5
<i>Dryopteris dilatata</i>	+	+	+	1	1	1	+	1	+	+
<i>Epilobium angustifolium</i>	+				+	+		+	+	+
<i>Galium saxatile</i>									+	
<i>Homogyne alpina</i>							+	1		
<i>Luzula sylvatica</i>				R		+		+		
<i>Oxalis acetosella</i>				+		+		r	+	+
<i>Populus tremula</i>		r		+						
<i>Picea abies</i>	+		+	1		+	+		+	
<i>Rubus idaeus</i>	+	5		+				+	+	+
<i>Sorbus aucuparia</i>	r									
<i>Vaccinium myrtillus</i>	30	30	35	5	40	2	40	2	1	50
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	+									
E₂	1	30	15	20	+	+	15	10	20	1
<i>Betula pendula</i>				1						
<i>Picea abies</i>		15	10	10		+	8	5	20	+
<i>Sorbus aucuparia</i>	1	15	5	5	+		8	5	+	+
E₃										
Mrtvé stojící dřevo	4	2	5	3	4	2	3	2		2
Mrtvé ležící dřevo	3	5	3	4	6	5	2	4	3	7

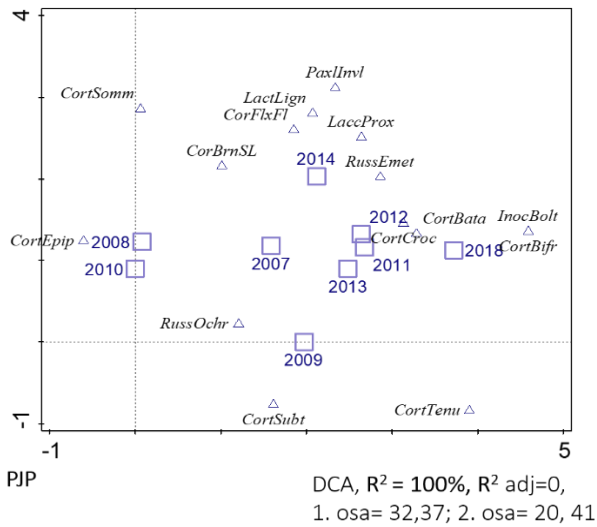
c) CJH

CJH	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
E₀	10	+	5	5	5	5	1	+	5	30
E₁	40	50	70	50	80	70	60	80	60	80
<i>Avenella flexuosa</i>	40	30	40	10	10	10	20	40	40	60
<i>Calamagrostis villosa</i>	+	20	20	40	70	60	40	40	20	20
<i>Dryopteris dilatata</i>	r	+	+	+	+	+	+	+		+
<i>Luzula sylvatica</i>	+	1	5	+						
<i>Lycopodium annotinum</i>	1	1	1							1
<i>Picea abies</i>	1	+	1					1		
<i>Vaccinium myrtillus</i>		r	R			r			r	
E₂					5	30				
<i>Picea abies</i>					5	25				
<i>Sorbus aucuparia</i>						5				
E₃										
Mrtvé stojící dřevo	0	0	0	Chybí údaj	1	1	0	0	0	3
Mrtvé ležící dřevo	1	1	1	Chybí údaj	1	3	6	4	5	0
Vývraty	1	1	1	Chybí údaj	0	0	1	2	1	1
Pařez	0	0	1	Chybí údaj	1	0	0	0	0	0

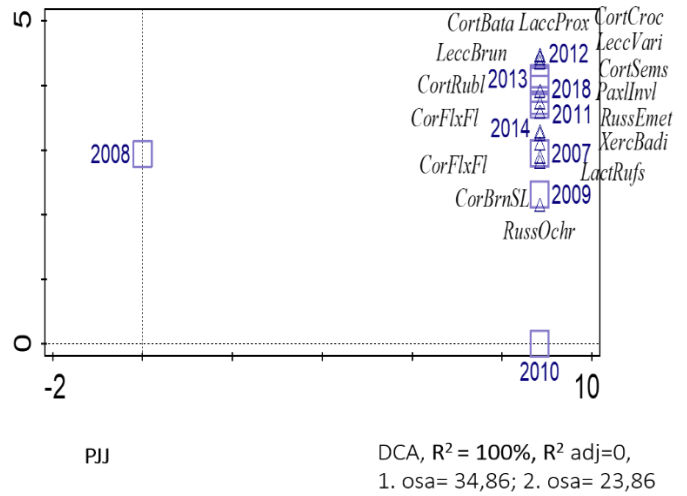
d) CJD

CJD	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
E₀	70	40	70	30	90	70	80	50	70	50
E₁	50	25	60	20	80	60	70	40	70	40
<i>Abies alba</i>				+	r				+	+
<i>Avenella flexuosa</i>	1	5								
<i>Picea abies</i>	5	+	1	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vaccinium myrtillus</i>	40	20	60	20	80	60	70	40	70	40
E₂	5							+		
<i>Abies alba</i>	+							+		
<i>Picea abies</i>	5									
E₃	60	70	50	60	30	70	50	30	70	60
<i>Abies alba</i>				20						
<i>Fagus sylvatica</i>		10							10	
<i>Picea abies</i>	60	60	50	40	30	70	50	30	60	60
Mrtvé stojící dřevo	2	0	2	0	2	0	0	0	1	0
Ležící smrk	1	větve	1	1	větve	větve	větve	1	1	0
Ležící buk		větve		větve	větve	0	větve	0	0	0
Stojící zdravé	1	0	1	6	3	5	2	1	2	3
Pařez	0	0	1		0	0	0	0	0	0

PLODNICE – VÝVOJ V ČASE

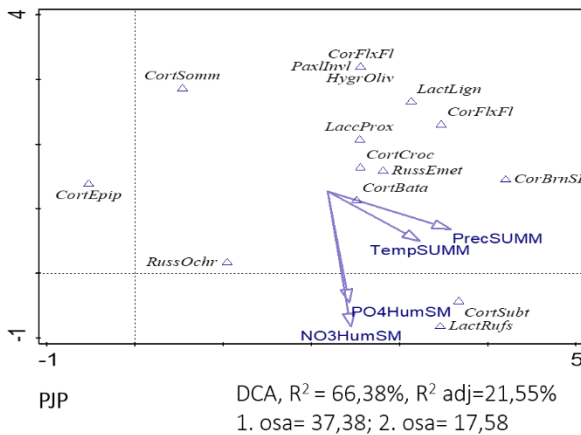


a) PJP – vývoj v čase

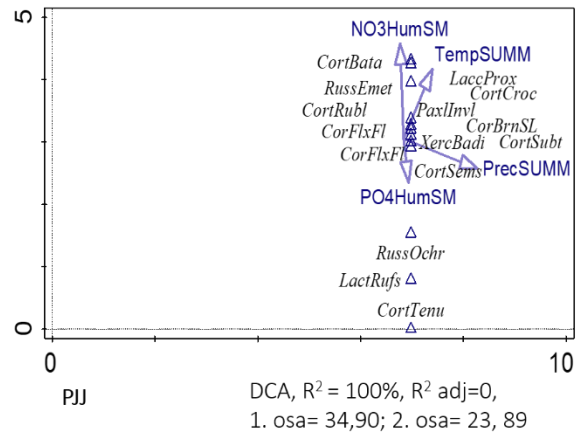


b) PJJ – vývoj v čase

PLODNICE A VLIV FAKTORŮ PROSTŘEDÍ



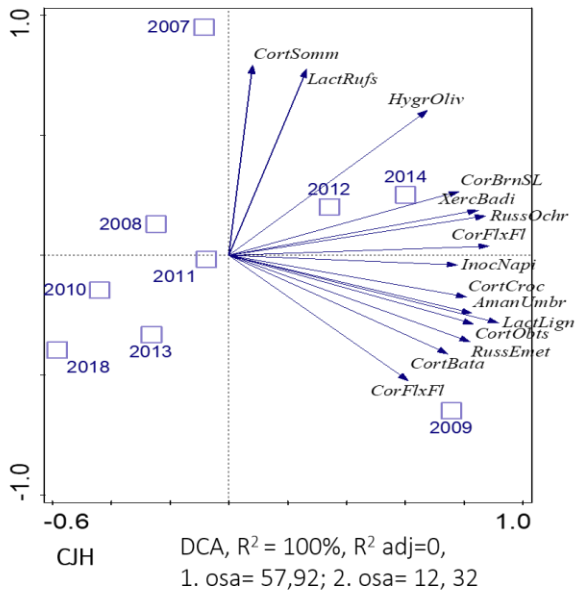
c) PJP – vliv faktorů prostředí



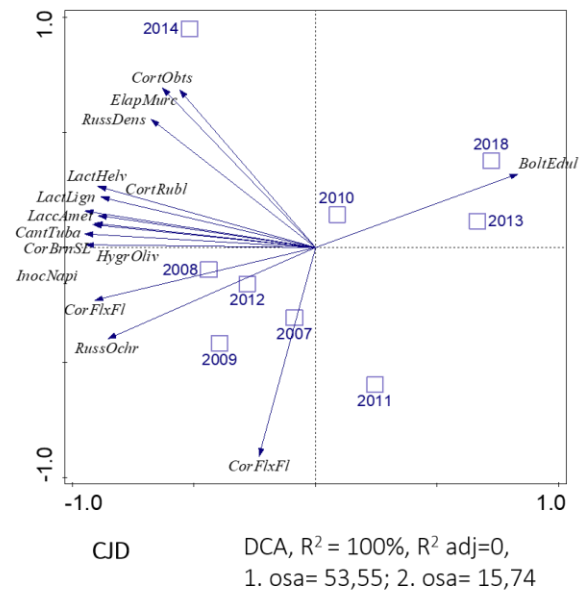
d) PJJ – vliv faktorů prostředí

Obr. 1 a), b), c), d): Analýza DCA testující vývoj společenstva ECM hub v čase a vliv faktorů prostředí na plochách PJP a PJJ.

PLODNICE – VÝVOJ V ČASE

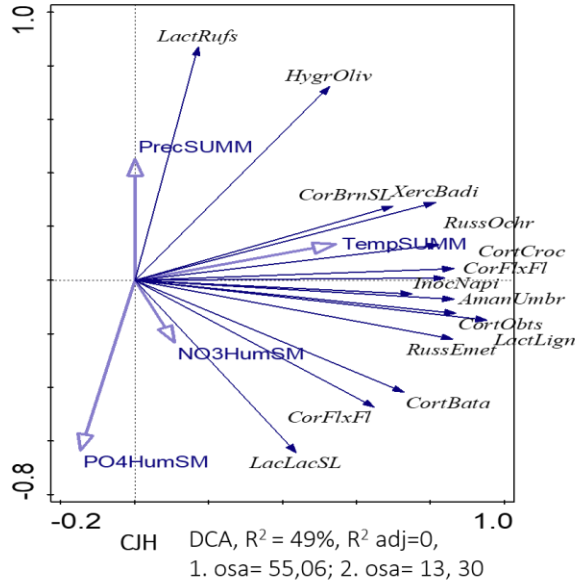


a) CJH – vývoj v čase

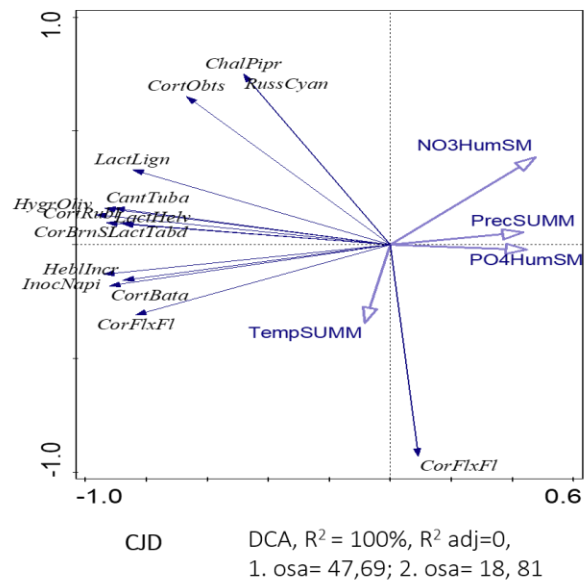


b) CJD – vývoj v čase

PLODNICE – VLIV FAKTORŮ PROSTŘEDÍ



c) CJH – vliv faktorů prostředí



d) CJD – vliv faktorů prostředí

Obr. 2 a), b), c), d): Analýza DCA testující vývoj společenstva ECM hub v čase a vliv faktorů prostředí na plochách CJH a CJD.

Tab. 4: Seznam plodnic, u nichž byla sekvenovaná DNA.

Vzorek	Původní název	Datum nálezu	Plocha nálezu	Určení dle sekvence	Referenční sekvence	Procento shody	Výsledné pojmenování
JK1	<i>Russula helodes</i>	24.09.2011	CJH	špatná sekvence			<i>Russula helodes</i> cf.
JK2	<i>Russula helodes</i>	26.8.2014	PJS	<i>Russula helodes</i>	MG687358	99	<i>Russula helodes</i>
JK3	<i>Cortinarius flos-paludis</i>	21.09.2012	CJD	<i>Cortinarius sphagnoravus</i>	MG136826.1	100	<i>Cortinarius flos-paludis</i>
JK4	<i>Cortinarius biformis</i>	24.09.2009	PJS	<i>Cortinarius biformis</i>	FJ039574.1	100	<i>Cortinarius biformis</i>
JK5	<i>Tomentella sp.</i>	30.08.2011	CJH	špatná sekvence			<i>Tomentella sp.</i>
JK6	<i>Cortinarius obtusus</i> cf.	09.10.2009	CJH	<i>Cortinarius junghuhnii</i>	HQ60466	99	<i>Cortinarius obtusus</i>
JK7	<i>Cortinarius</i> cf. <i>fulvescens</i>	09.10.2012	PJS	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	KX388644	99	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>
JK8	<i>Cortinarius umbrinolens</i> cf.	10.10.2012	CJD	<i>Cortinarius comptulus</i>	FJ039543.1	100	<i>Cortinarius comptulus</i>
JK9	<i>Cortinarius acutus</i>	10.10.2012	CJD	<i>Cortinarius acutus</i>	AY669655	99	<i>Cortinarius acutus</i>
JK10	<i>Cortinarius anglesianus</i>	10.10.2012	CJD	<i>C. anglesianus</i>	KJ70513	100	<i>Cortinarius angelesianus</i>
JK11	<i>Cortinarius anomali</i>	14.09.2014	CJD	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius</i> sp. (s. <i>Anomali</i>)
JK12	<i>Cortinarius bataillei</i>	09.10.2012	PJP	špatná sekvence			<i>Cortinarius bataillei</i>
JK13	<i>Cortinarius bruneus</i>	30.08.2011	CJD	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius brunneus</i> s.l.
JK14	<i>Cortinarius croceus</i>	14.10.2014	PJJ	<i>C. croceus</i>	KY96483	100	<i>Cortinarius croceus</i>
JK15	<i>Cortinarius delibutus</i>	18.09.2007	CJD	<i>C. delibutus</i>	KC84244	99	<i>Cortinarius delibutus</i>
JK16	<i>Cortinarius dlouhý bílý třeň(tel3)</i>	09.10.2012	PJS	<i>C. biformis</i>	MH78471	99,8	<i>C. biformis</i>
JK17	<i>Cortinarius evernius</i>	02.09.2014	PJP	<i>Cortinarius tortuosus</i>	AY66966	99	<i>Cortinarius tortuosus</i>
JK18	<i>Cortinarius fasciatus</i>	23.09.2012	PJS	špatná sekvence			<i>Cortinarius fasciatus</i>
JK19	<i>Cortinarius flexipes</i> var <i>flabellus</i>	10.10.2012	PJP	<i>Cortinarius diasemospermus</i>	JQ72402	98	<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flabellus</i>
JK20	<i>Cortinarius flexipes</i> var <i>flexipes</i>	10.10.2012	CJD	<i>Cortinarius flexipes</i>	KY28773	100	<i>Cortinarius flexipes</i> var. <i>flexipes</i>
JK21	<i>Cortinarius jubarinus</i>	24.09.2009	PJS	<i>Cortinarius biformis</i>	MH78471	99	<i>Cortinarius biformis</i>

JK22	<i>Cortinarius junguhuhnii</i>	22.10.2013	PJS	špatná izolace DNA (double)			<i>Cortinarius junguhuhnii</i>
JK23	<i>Cortinarius kužel. Klobouk, načervenalý třeň</i>	23.09.2012	PJS	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	KX38864	99	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>
JK24	<i>Cortinarius laetus</i>	16.09.2014	PJS	<i>Cortinarius fulvescens</i>	KX38863	99	<i>Cortinarius laetus cf.</i>
JK25	<i>Cortinarius lignicolus</i>	23.09.2009	CJD	<i>Cortinarius somerfeldtii</i>	KY28773	99,6	<i>Cortinarius somerfeldtii</i>
JK26	<i>Cortinarius malachius</i>	16.09.2014	PJS	<i>Cortinarius malachius</i>	MG59735	100	<i>Cortinarius malachius</i>
JK27	<i>Cortinarius myx.</i>	16.09.2014	CJD	špatná izolace DNA (double)			<i>Cortinarius (Myx.) sp. - bílý kl.</i>
JK28	<i>Cortinarius patibilis</i>	26.08.2014	PJS	<i>Cortinarius vacciniophilus</i>	NR1579	99	<i>Cortinarius vacciniophilus</i>
JK29	<i>Cortinarius pilatii aff</i>	24.09.2010	CJD	<i>Cortinarius flexipes</i>	AY66968	100	<i>Cortinarius flos-paludis</i>
JK30	<i>Cortinarius pilatii cff</i>	24.09.2010	CJD	špatná sekvence			<i>Cortinarius pilatii cf.</i>
JK31	<i>Cortinarius pluvalis cf.</i>	05.09.2008	CJD	špatná sekvence			<i>Cortinarius pluvalis cf.</i>
JK32	<i>Cortinarius radiálně rozpraskaný</i>	12.9.2012	PJS	<i>Cortinarius biformis</i>	MH78471	99	<i>Cortinarius biformis</i>
JK33	<i>Cortinarius rubellus</i>	18.09.2007	CJD	<i>Cortinarius rubellus</i>	AY66959	100	<i>Cortinarius rubellus</i>
JK34	<i>Cortinarius sanguineus var vitiosa</i>	25.08.2010	PJS	<i>Cortinarius vitiosus</i>	JN11409	99	<i>Cortinarius vitiosus</i>
JK35	<i>Cortinarius scadens</i>	23.09.2009	CJH	<i>Cortinarius obtusus</i>	KY28771	99,7	<i>Cortinarius obtusus</i>
JK36	<i>Cortinarius s fialovou dužinou na špičce třeně</i>	10.10.2012	PJS	<i>Cortinarius biformis</i>	MH78471	99	<i>Cortinarius biformis</i>
JK37	<i>Cortinarius somerfeldtii</i>	10.10.2012	CJH	<i>Cortinarius croceus</i>	UDB0011	99	<i>Cortinarius somerfeldtii</i>
JK38	<i>Cortinarius tortuosus</i>	10.10.2012	CJD	<i>Cortinarius tortuosus</i>	AZ66966	100	<i>Cortinarius tortuosus</i>
JK39	<i>Cortinarius 3</i>	03.10.2008	CJD	<i>Cortinarius biformis</i>	AY66968	99,8	<i>Cortinarius biformis</i>
JK40	<i>Cortinarius 4</i>	05.09.2008	CJD	špatná sekvence			<i>Cortinarius 4</i>
JK41	<i>Cortinarius 5</i>	09.10.2009	CJD	špatná sekvence			<i>Cortinarius 5</i>
JK42	<i>Cortinarius 7-8</i>	09.10.2009	CJH	<i>Cortinarius tortuosus</i>	AY66966	100	<i>Cortinarius tortuosus</i>
JK43	<i>Cortinarius 9</i>	06.10.2012	PJS	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius 9</i>
JK44	<i>Cortinarius (Tel.) sp. 12</i>	10.10.2012	CJD	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius (Tel.) sp. 12</i>

JK45	<i>Cortinarius 15</i>	02.09.2014	PJS	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius 15</i>
JK46	<i>Cortinarius 16</i>	02.09.2014	PJS	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius 16</i>
JK47	<i>Cortinarius 17-18</i>	14.09.2014	CJD	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius 17-18</i>
JK48	<i>Cortinarius 19</i>	16.09.2014	PJS	špatná izolace DNA			<i>Cortinarius 19</i>
JK50	<i>Cortinarius (Tel.) sp. rezavohnědý</i>	10.10.2012	CJD	<i>Cortinarius biformis</i>	MH78471	99,4	<i>Cortinarius biformis</i>
JK51	<i>Cortinarius umbrinolens aff.</i>	18.9.2007	CJD	špatná sekvence			<i>Cortinarius umbrinolens aff.</i>
JK52	<i>Cortinarius (Tel.) sp. - drobný, kl. tmavě načervenalé hnědý 12_6 velké mandl spory</i>	23.9.2009	PJS	<i>Cortinarius obtusus</i>	AJ43898	100	<i>Cortinarius obtusus</i>
JK53	<i>Cortinarius béžový, s řídkými lupeny(13)</i>	20.09.2018	PJP	<i>Cortinarius biformis</i>	MH78474	100	<i>Cortinarius biformis</i>
JK54	<i>Cortinarius s bělavým pod kloboukem nafialovělým třeněm(20)</i>	20.09.2018	PJP	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	KX38864	96	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>
JK55	<i>Cortinarius s něžně nafialovělým třeněm pod kl., kl 2 cm(26)</i>	20.09.2018	PJP	<i>Cortinarius biformis</i>	KY96477	100	<i>Cortinarius biformis</i>
JK56	<i>Cortinarius bez vůně,sv.rez.kl.(72)</i>	11.10.2018	CJH	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	KX38864	100	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>
JK57	<i>Cortinarius cf infractus</i>	11.10.2018	CJD	<i>Cortinarius scaurus</i>	NR157957.1		<i>Cortinarius scaurus</i>
JK58	<i>Inocybe boltoni(25)</i>	20.09.2018	PJP	špatná sekvence			<i>Inocybe boltoni</i>
JK59	<i>Russula pálivá s ovocnou vůní</i>	20.09.2018	PJP	<i>R. atrorubens</i>	KX57982	99,5	<i>Russula atrorubens</i>
JK60	<i>Cortinarius bělavé velum bez vůně, vrchol fialový</i>	04.10.2018		<i>Cortinarius biformis</i>	KY96477	99,4	<i>Cortinarius biformis</i>
JK61	<i>Cortinarius obtusus</i>	04.10.2018		<i>Cortinarius biformis</i>	MH784719	99,4	<i>Cortinarius biformis</i>
JK62	<i>Cortinarius obtusus</i>	09.10.2018	CJH	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>	GQ15985	100	<i>Cortinarius tenuifulvescens</i>

Tab. 5: Seznam druhů zaznamenaných pomocí sekvencí DNA z půdy na jednotlivých plochách.

PJP	PJJ	CJD	CJH
<i>Amanita fulva</i>	<i>Amanita submembranacea</i>	<i>Meliniomyces variabilis</i>	<i>Amanita olivaceogrisea</i>
<i>Amanita olivaceogrisea</i>	<i>Amanita olivaceogrisea</i>	<i>Thelephora terrestris</i>	<i>Genea hispidula</i>
<i>Amanita submembranacea</i>	<i>Boletus pinophilus</i>		<i>Inocybe krieglsteineri</i>
<i>Byssocorticium pulchrum</i>	<i>Cortinarius paleifer</i>		<i>Meliniomyces variabilis</i>
<i>Cortinarius angelesianus</i>	<i>Craterellus tubaeformis</i>		<i>Xerocomus ferrugineus</i>
<i>Cortinarius comptulus</i>	<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>		
<i>Cortinarius diasemospermus</i>	<i>Hygrophorus pustulatus</i>		
<i>Cortinarius flexipes</i>	<i>Imleria badia</i>		
<i>Cortinarius paleifer</i>	<i>Inocybe krieglsteineri</i>		
<i>Craterellus tubaeformis</i>	<i>Meliniomyces variabilis</i>		
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	<i>Piloderma sphaerosporum</i>		
<i>Chamonixia caespitosa</i>	<i>Russula ochroleuca</i>		
<i>Imleria badia</i>	<i>Sebacina sp</i>		
<i>Inocybe napipes</i>	<i>Thelephora terrestris</i>		
<i>Meliniomyces variabilis</i>	<i>Tomentella sp.</i>		
<i>Piloderma byssinum</i>	<i>Tylospora fibrillosa</i>		
<i>Piloderma sphaerosporum</i>	<i>Tylospora asterophora</i>		
<i>Russula aurora</i>	<i>Xerocomus ferrugineus</i>		
<i>Russula emetica</i>			
<i>Russula fellea</i>			
<i>Russula ochroleuca</i>			
<i>Russula paludosa</i>			
<i>Thelephora terrestris</i>			
<i>Tylospora asterophora</i>			
<i>Tylospora fibrillosa</i>			

Izolace DNA – CTAB metoda

- 1) Do 1,5 ml eppendorfky s rovným (!) víčkem vložíme vhodné množství suché tkáně (obvykle 5–15 mg) a dvě kovové kuličky (pro drcení tvrdších tkání je možné použít více kuliček).
- 2) Eppendorfky upneme do nástavců mlýnku Retsch 400MM – použijeme oba nástavce, abychom vyvážili obě ramena. Nastavíme základní dobu homogenizace: 1 min. na maximální rychlost. Podle tuhosti materiálu dobu homogenizace případně prodloužíme.
- 3) K rozdrcenému materiálu přidáme 700 µl zásobního roztoku CTAB a 10 µl 2-merkaptoethanolu. Pracujeme v digestoři.
- 4) Zkumavky uzavřeme, promícháme proklepáním a inkubujeme 30 min na třepačce při 50°C (pokud není třepačka k dispozici, použijeme termoblok a zkumavky občas promícháme).
- 5) Při použití kovových kuliček vzorky krátce stočíme na stolní centrifuze (2-3 s), a roztoky přeneseme do nových označených 1,5 ml eppendorfek (u vzorků s větším výchozím množstvím materiálu lze oddělit zbytky tkání prodloužením doby centrifugace – např. 1 min při 10 000 rpm). Kuličky vyklepneme do Petriho misky, propláchneme vodou a osušíme buničinou – nenecháváme je ve vodě, korodují!
- 6) Přidáme 500 µl směsi chloroform : isoamylalkohol (24:1). Pracujeme v digestoři.
- 7) Dobře uzavřené zkumavky několikrát převrátíme a necháme cca 5 min stát.
- 8) Centrifugujeme 10 min při 10 000 rpm.
- 9) Horní vodnou fázi (cca 500 µl) opatrně přepipetujeme do nových označených 1,5 ml eppendorfek. Pracujeme v digestoři. Použité špičky vyhazujeme do nádoby na nebezpečný odpad, stejně tak použité eppendorfky, a odpadní fázi s chloroformem slijeme do příslušné lahve na nebezpečný odpad (označena „odpad – chloroform“). Pouze horní, vodní fáze obsahuje DNA. Je nutné vyhýbat se rozhraní a spodní chloroformové fázi (zbytky tkání a hydrofobní odpadní látky jako mastné kyseliny, proteiny, apod.), které by znehodnotily DNA a snížily výtěžek. Pokud dojde ke kontaminaci chloroformovou fází, odebraný supernatant znovu centrifugujeme a do nové zkumavky znovu odebereme pouze horní fázi. Postup s přidáním směsi chloroform : isoamylalkohol a odebráním horní vodní fáze (kroky 6–9) je možné několikrát zopakovat.
- 10) Přidáme 500 µl vychlazeného isopropanolu (z mrazáku).
- 11) Dobře uzavřené zkumavky několikrát převrátíme (netřepeme) a necháme cca 30 min stát v – 20 °C.

- 12) Centrifugujeme 5 min při 13 000 rpm.
- 13) Supernatant opatrně odpipetujeme do kádinky na odpad (v digestoři, použijeme špičky na 200 µl). Na dně eppendorfky by měl být vidět drobný matně bílý až mírně zbarvený pelet DNA. Po skončení práce vylijeme obsah kádinky do příslušné lahve na nebezpečný odpad (označena „odpad – isopropanol“).
- 14) Přidáme 400 µl vychlazeného 96 % ethanolu (z mrazáku), promícháme proklepnutím - pelet je vhodné uvolnit od stěny zkumavky, aby volně plaval v kapalině (už není nutné pracovat v digestoři).
- 15) Inkubujeme 15 min v termobloku při 37 °C.
- 16) Centrifugujeme 5 min při 13 000 rpm.
- 17) Supernatant opět opatrně odpipetujeme do kádinky na odpad.
- 18) Přidáme 200 µl vychlazeného 70 % ethanolu (z mrazáku), promícháme proklepnutím (pelet je vhodné uvolnit od stěny zkumavky, aby volně plaval v kapalině) a necháme cca 5 min stát při pokojové teplotě.
- 19) Centrifugujeme 5 min při 13 000 rpm.
- 20) Supernatant opět opatrně odpipetujeme do kádinky.
- 21) Otevřené zkumavky necháme přibližně 15 min sušit při pokojové teplotě. Sušení ukončíme ve chvíli, kdy jsou stěny eppendorfky suché, bez viditelných kapek ethanolu.
- 22) K vysušenému peletu přidáme (10–)30(–200) µl TE pufru nebo sterilní vody. Objem kapaliny je vhodné přizpůsobit výtěžku izolace – u vzorků s velkými DNA pelety použít větší objem, u vzorků s malými pelety menší objem, aby se DNA zbytečně neředila.
- 23) Pro úplné rozpuštění DNA necháme vzorky stát přes noc v ledničce, případně lze použít inkubaci ca 30 min při pokojové teplotě a míchání občasným proklepáváním prstem.
- 24) Před použitím vzorky promícháme proklepnutím a krátce stočíme na stolní centrifuze. Kvalitu a koncentraci vyizolované DNA ověříme elektroforézou na agarosovém gelu.
- 25) Vyizolovanou DNA krátkodobě (dny až pár týdnů) skladujeme v ledničce, pro dlouhodobé uchování DNA zamrazíme (-20 °C).

Citace: Koutecký P., Košnar J. (2017) Metody molekulární biologie v rostlinné ekologii a systematice, Laboratoř molekulární biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta JU

Příprava knihoven a Illumina sekvenace

DNA byla ze vzorků půdy izolována pomocí kitu DNEasy PowerSoil Kit (MoBio, USA), dle návodu výrobce. Příprava knihoven a sekvenování houbové ITS1 oblasti (primery ITS1F a ITS2; White et al., 1990) bylo provedeno externí laboratoří (SEQme, Česká republika). PCR reakce obsahovala 13 μ l MO BIO PCR-grade vody, 10 μ l 5 PRIME HotMasterMix, 0.5 μ l obou dopředných a zpětných primerů (0.2 μ M koncová koncentrace) a 1 μ l of genomické DNA. Denaturační fáze 94°C pod dobu 3 minut byla následována 35 cykly: 94 °C 45 s, 50 °C 60 s a 72 °C 90 s zakončenými 10 minutovou extenzí při 72°C. Zpětný primer obsahoval 12-bázový multiplexing Golay barkód. Každý vzorek byl amplifikován v triplikátu, následně smíchán a kvantifikován pomocí Invitrogen PicoGreen a mikrodestičkového readeru. Následně byly amplikony ze všech vzorků ekvimolárně smíchány a přečištěny pomocí Ultra Clean® htp 96-well PCR clean up kitu (MO BIO Laboratories). Čistota a koncentrace vzorků byla ověřena pomocí spektrofotometrie a gelové elektroforézy. Amplikony byly paired-end sekvenovány (150x150 cyklů) na platformě Illumina MiSeq (SEQme, Česká republika).

Dodavatelem demultiplexovaný dataset hrubých sekvencí byl přečištěn dle kvality (min. skóre phred kvality 25, žádné neurčité báze) pomocí PRINSEQ-lite 0.20.4 (Schmieder and Edwards, 2011). ITS1 region byl z houbových readů extrahován pomocí algoritmu ITSx 1.0.11 (Bengtsson-Palme et al., 2013). Krátké ITS1 sekvence (<150 bp) byly následně vyřazeny. USEARCH 8.1 (Edgar, 2010) byl použit pro konstrukci OTU tabulky (singletons odstraněny, podobnost 98.5%). Taxonomie byla přiřazena algoritmem BLAST (Altschul et al., 1990) skrze skript parallel_assign_blast.py script v rámci pipeline QIIME v 1.9.1 (Caporaso et al., 2010) za pomoci databáze and UNITE 7.2 (Koljalg et al., 2013). Ze seznamu nalezených sekvencí byly následně pomocí literatury ručně vybrány ektomykorhizní druhy, popř. rody (Tedersoo et al., 2010; Rinaldi et al., 2008).

Citace k přípravě knihoven a Illumina sekvenace:

White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), pp. 315 – 322. Academic Press, London

Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets [Online]. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>.

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., et al. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data [Online]. *Methods In Ecology And Evolution*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073>

Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [Online]. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool [Online]. *Journal Of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., et al. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [Online]. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 108(Supplement_1), 4516-4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>

Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., et al. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [Online]. *Molecular Ecology*, 22(21), 5271-5277. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>