

Česká lesnická společnost, o.s.,
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.,
za finanční podpory
Ministerstva zemědělství, úsek lesního hospodářství



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

MYKORHIZA V LESÍCH A MOŽNOSTI JEJÍ PODPORY

SBORNÍK REFERÁTŮ



Středa a čtvrtek, 15.-16. dubna 2009
Lidový dům; F. Čejky 450, Frýdek-Místek

Odborní garanti:**Doc. Ing. Jaroslav Holuša, Ph.D.****Ing. Vítězslava Pešková, Ph.D.**

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.
Strnady 136, 252 02 Jíloviště
tel.: 558 628 647, e-mail: holusaj@seznam.cz

Organizační garant:**Ing. Karel Vančura**

Česká lesnická společnost, o.s.

Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1

Tel: 776 791 401, e-mail: cesles@csvts.cz

Exkurze:

SZKÓŁKA KONTENEROWA Nadleśnictwa Rudy Raciborskie, Polsko
Bude předveden v celé šíři provoz v kontejnerové školce, kde jsou mykorhizní houby zapravovány do substrátu umístovaném do kontejnerů se školkovanými sazenicemi, technické vybavení školky i pracovní zázemí.

Fota na obálce:

Sazenice smrku mykorhizované ektomykorhizní houbou
Hebeloma crustuliniforme. (Ing. V. Pešková, Ph.D.)

Detail mycelia na kořínku smrku s ektomykorhizní houbou
Hebeloma crustuliniforme. (Ing. V. Pešková, Ph.D.)

Seminář je zaměřený na stručnou charakteristiku mykorhiz, možnosti jejich využití v lesích, praktické podpory a seznámení s prvními výsledky inokulací sadebního materiálu a jeho výsadeb v oblastech s dlouhodobě zvýšeným stavem václavky. Součástí dvoudenního semináře bude exkurze do moderní školky se zavedenou inokulací kontejnerovaného sadebního materiálu v Polsku.

Autor souhlasí se zveřejněním svého příspěvku ve sborníku a na internetu. V případě použití kterékoli části příspěvku bude ze strany ČLS vyžadována přesná citace autora.

Texty ve sborníku neprošly jazykovou úpravou.

Technická spolupráce:**Lesnická práce, s. r. o.**

nakladatelství a vydavatelství

Zámek 1, 281 63 Kostelec nad Černými lesy

neuhoferova@lesprace.cz

Česká lesnická společnost**ISBN 978-80-02-02121-6**

Obsah

- 4 Milan Gryndler, Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.
Mykorhizní symbióza - O soužití hub s kořeny rostlin
- 10 Kazimierz Szabla, Katowice, Polsko
Mikoryza w leśnictwie i mikoryzacja sadzonek w praktyce
- 22 Filip Holub^{1,2}, Miloň Dvořák¹, Pavel Cudlín², Ewa Chmelíková²,
¹ÚOLM, LDF MZLU v Brně, ²Ústav systémové biologie a ekologie, AV ČR, v.v.i.
Ektomykorhizní poměry přirozených smrčín Krkonoš (výskyt plodnic, morfologie ektomykorhiz, molekulárně-biologické analýzy)
- 29 Vítězslava Pešková, František Soukup, VÚLHM, v.v.i.
Aktuální mykorhizní situace krkonošských smrčín
- 38 Libuše Vostrá¹, Jaroslav Holuša^{1,2}, ¹FLD, ČZU v Praze, ²VÚLHM, v.v.i.
Stav smrkových kultur po aplikaci mykorhizního přípravku
- 43 Vladislav Čurn¹, Barbora Kubátová¹, Miloslava Kavková², Vendula Endrychová¹, ¹JU v Českých Budějovicích, Biotechnologické centrum, ²JU v Českých Budějovicích, PF
Aplikace PCR technik ve studiu biodiverzity mykorhizních hub
- 52 Anna Tučeková, Valéria Longauerová, Roman Leontovyč, NLC – LVÚ Zvolen
Poznatky z testovania mykorizovaného preparátu Vambac na smreku (*Picea abies* L.) v oblasti s dlhodobou zvýšeným stavom *Armillaria* sp.

MYKORHIZNÍ SYMBIÓZA - O SOUŽITÍ HUB S KOŘENY ROSTLIN

Milan Gryndler
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

Symbióza jako přírodní fenomén

Termínu symbióza se původně užívalo k pojmenování dlouhodobého a těsného soužití dvou různých organismů (DE BARY 1879) a tento termín pokrýval široké spektrum vzájemných vztahů – od symbiózy oboustranně prospěšné (mutualistické) po symbiózu parazitickou (kdy jeden ze zúčastněných organismů žije na úkor druhého). Postupem doby začal být termín symbióza chápán a používán v užším slova smyslu, tedy pro označení mutualistické symbiózy. Přesto se v posledních desetiletích, spolu s poznáním, že symbiotické vztahy jsou funkčně velmi různorodé, znovu začíná uplatňovat širší chápání tohoto termínu. Je velmi obtížné definovat, jaký vztah ještě je a jaký již není symbiózou v širokém smyslu slova a je velmi pravděpodobné, že tyto dva způsoby koexistence organismů nelze ostře odlišit. Důkladnější definice termínu symbióza totiž předpokládají, že symbiotické organismy žijí v úzkém vzájemném vztahu, přičemž zároveň neposkytují dostatečně silné kritérium pro určení, který vztah je úzký a který již nikoli. Méně náročné definice charakterizují symbiózu pouze jako soužití dvou nebo více různých organismů.

Zdá se, že většina organismů v biosféře žije v nějaké formě symbiotického vztahu v širokém smyslu slova, neboť všechny složky biosféry na sebe nějakým způsobem více či méně působí, i v úzkém smyslu slova (tj. vztah prostorově vázaného „hostitele“ se „symbiontem“). I každá eukaryotní buňka (včetně buněk lidského těla) může být totiž považována za symbiotickou strukturu složenou z několika vzájemně velmi úzce spolupracujících a dnes již neoddělitelných organismů. Důvod, proč existuje v přírodě bezpočet příkladů symbiózy mezi různými organismy není dosud zcela jasný a zřejmě nespočívá pouze v evolučních výhodách plynoucích ze vzniku symbiotického vztahu (SMITH 1991). Zřejmě jde zejména o výraz velmi silné tendence živých struktur k sebeorganizaci, specializaci a zvyšování složitosti (MARGULIS 1999).

Charakteristika mykorhizní symbiózy

Mykorhizní symbióza je zvláštním případem symbiózy obecně, a to takovým případem, kdy jedním partnerem je houba (označujeme ji jako mykobiont) a druhým partnerem je rostlina, přesněji: její pletiva kořenové pokožky a primární kořenové kůry (rostlinu v tomto případě označujeme jako fytobiont). I v případě mykorhizní symbiózy badatelé často podléhají pravděpodobně mylné tendenci vysvětlovat její existenci výhradně jako důsledek vzájemně prospěšné spolupráce mezi fytobiontem a mykobiontem, tedy čistě fyziologickými důvody.

Mykorhizní symbióza je v přírodě velmi rozšířena. Vlastně je možno říci, že pěstujeme-li pokusně rostlinu v nepřítomnosti mykorhizních hub, činíme cosi velmi nepřírozeného. Nějakou mykorhizní houbu totiž ve svých kořenech hostí velká většina rostlin, a to včetně lesních dřevin všech podnebných pásů. Nalézt v přírodě rostlinu bez mykorhizních hub je proto obtížné.

Rozeznáváme několik typů mykorhizní symbiózy. Tzv. endomykorhizní typy se vyznačují pronikáním mykorhizní houby do vnitřního prostoru buněk hostitelova kořene. Jsou to arbuskulární mykorhizní symbióza, erikoidní mykorhizní symbióza a orchideoidní mykorhizní symbióza. Další typ, ektomykorhizní symbióza, je naopak charakteristický tím, že se mykorhizní houba nachází pouze v prostorech mezi buňkami, v mezibuněčných (intercelulárních) prostorech.

Mykorhizní houby (mykobionti) patří mezi houby stopkovýtrusé (*Basidiomycota*, bazidiomycety), vřeckovýtrusé (*Ascomycota*, askomycety), spájkivé (*Zygomycota*, zygomycety) a mezi houby patřící do velké, česky nepojmenované skupiny (fyla) *Glomeromycota* (GRYNDLER et al. 2004).

Arbuskulární mykorhizní symbióza je v přírodě nejrozšířenějším a vývojově nejstarším typem mykorhizní symbiózy. Je charakteristická mezibuněčnými i vnitrobuněčnými vlákny houby (hyfami) a zejména zvláštními bohatě větvenými vnitrobuněčnými útvary nazývanými arbuskuly. **Orchideoidní mykorhizní symbióza** se vyskytuje pouze u orchidejí (rostlin řádu *Orchidales*). Je charakteristická závitými hyfami (smotky, pelotony) uvnitř buněk hostitele a jeho dvojí kolonizací. První kolonizace nastává záhy po vyklíčení semene v prvoklíčku (protokormu). Druhá kolonizace probíhá v kořenových pletivech. Kolonizovány jsou buňky kořenové kůry, pokožkou houba pouze proniká. Jako mykobionty zde vystupují zejména stopkovýtrusé houby. **Erikoidní mykorhizní symbióza** se vyskytuje u rostlin řádu *Ericales*. Vyznačuje se také závitými hyfami (smotky) uvnitř buněk, je však působena jinými mykorhizními houbami než mykorhizní symbióza orchideoidní - zejména houbami vřeckovýtrusými. Nejvíce jsou kolonizovány buňky kořenové pokožky, směrem do hloubky kořenových pletiv houbových struktur rychle ubývá. **Ektomykorhizní symbióza** je charakteristická tím, že houba neproniká buněčnou stěnou do vnitřního prostoru buněk hostitele. Na rozdíl od výše zmíněných endomykorhizních typů symbiózy je houbou kolonizovaný úsek kořene (mykorhiza) často morfologicky změněný (ztlustlý), a výrazně se tak tvarem odlišuje od kořenů nekolonizovaných. Hyfy hub v mezibuněčných prostorech zpravidla tvoří tzv. Hartigovu síť a spleť hyf na povrchu kolonizovaného kořene (mykorhizy) bývá označována jako hyfový plášť. Ektomykorhizní symbióza je známa téměř výlučně u dřevin a je tvořena ponejvíce houbami stopkovýtrusými a vřeckovýtrusými. Z hub spájkivých je známo jen několik málo druhů, které žijí v ektomykorhizní symbióze.

Mnoho různých druhů mykorhizních hub se v půdě vyskytuje současně a tvoří zde společenstvo. Vlákna mykorhizních hub propojují vnitřní prostor kořene s půdním prostředím a vytvářejí heterogenní objemnou síť, která bývá někdy nazývána mycelální kontinuum. Houba však nekolonizuje kořen zcela, ale omezuje se na některé jeho části - na kořenovou pokožku (rhizodermis) a na primární kořenovou kůru, tj. na zpravidla několik dalších vrstev buněk pod kořenovou pokožkou.

Vztah mezi mykobiontem a fytoiontem je v mykorhizní symbióze velmi jemně vyladěný, přičemž dochází k aktivaci řady genů, které jsou v nemykorhizním kořeni neaktivní nebo málo aktivní, a k omezení aktivity jiných genů, které se naopak v mykorhizním kořeni neprojeví. Tyto jevy, tzv. změny regulace genové exprese, a s nimi spojený tok informace mezi oběma partnery jsou předmětem intenzivního zájmu špičkových výzkumných pracovišť, která se výzkumem mykorhizní symbiózy dnes zabývají. Řada nových poznatků přichází zejména ze studia regulace genové exprese u arbuskulární mykorhizní symbiózy (SEDDAS et al. 2009), která je z fyziologického a biochemického hlediska poněkud přehlednější (homogennější) než ektomykorhizní symbióza. Ostatní typy mykorhizní symbiózy jsou z tohoto hlediska studovány méně.

Vlastnosti thallu (mycelia) mykorhizních hub určují ekologické vlastnosti mykorhizní symbiózy

Všechny mykorhizní houby různých typů mají několik ekologicky důležitých společných vlastností, které umožňují, abychom se zamýšleli nad ekologickým významem mykorhizní symbiózy obecně a abychom také mohli obecně chápat fyziologii mykorhizní symbiózy.

Jsou to tyto vlastnosti:

1. Velký povrch mycelia a současně schopnost zasahovat i do nepatrných půdních prostor, které jsou kořenovému systému rostlin přímo nedostupné.
2. Schopnost přímé výměny látek s hostitelskou rostlinou prostřednictvím těsného fyzického kontaktu i výměny látek s půdním prostředím.
3. Existence vláknité stélky (mycelia), umožňující přenos látek cytoplazmou (transport) na významné vzdálenosti.

Z těchto tří vlastností vyplývá základní ekologická charakteristika mykorhizní symbiózy: mykorhizní houby účinně propojují kořenový systém hostitelské rostliny s prostředím. Většina znalostí, které dnes o tomto propojení máme, se týká výměny hmoty; o toku energie mezi rostlinou a půdou máme vědomostí méně. Velmi málo víme o výměně informace, tedy například o tom, jak mykorhizní houby na základě přítomnosti různých signálních látek upravují své vztahy k jiným půdním organizmům.

Mykorhizní houby a organický uhlík v půdě

Výše zmíněnou myšlenku propojení půdy a rostliny lze nejlépe doložit chováním mycelia arbuskulárních mykorhizních hub. Toto mycelium je nepřehrádkované (cenocytické) a nejlépe je možno si představit jeho funkci jako funkci jemného potrubí, jímž obousměrně proudí cytoplazma unášející různé látky. Účinně rozvádí v půdě organicky vázaný uhlík, který byl hostitelskou rostlinou při fotosyntéze zabudován do organických látek a transportován do kořene. Jde o proces dosti rychlý. Bylo zjištěno, že v průběhu 21 hodin po asimilaci projde 4–6% asimilovaného uhlíku myceliem mykorhizní houby, je prodýcháno a opět ve formě CO₂ navraceno do atmosféry (JOHNSON et al. 2002).

Toto rozvádění uhlíku arbuskulárními mykorhizními houbami má důležité ekologické důsledky. Je například důvodem snížené kompetice (soutěžení o zdroje) mezi jednotlivými rostlinnými druhy v rostlinném společenstvu, protože mykorhizní houba je schopna transportovat uhlík (ve formě uhlíkatých organických látek) získaný od jedné hostitelské rostliny k rostlině druhé, jak bylo prokázáno s využitím radioaktivního izotopu uhlíku ¹⁴C (LERAT et al. 2002).

Podobně i myceliální síť tvořená ektomykorhizními houbami je schopna obohacovat půdní prostředí organickými látkami získanými při fotosyntéze hostitelskou rostlinou. Bylo to dokumentováno pokusem, při němž byly ektomykorhizní a kontrolní rostliny borovice *Pinus densiflora* inkubovány v atmosféře obsahující oxid uhličitý značený radioaktivním uhlíkem ¹⁴C (WU et al. 2002). Radioaktivita se nejprve objevila v jehličí a později pronikala do kořenů a půdního mycelia neidentifikované mykorhizní houby. Na základě těchto výsledků lze odhadnout, že zhruba 24% asimilovaného uhlíku transportovaného původně do kořenového systému rostlin se nakonec dostalo do mycelia ektomykorhizní houby, odkud mohlo být uvolněno do půdního prostředí ve formě nejrůznějších produktů metabolismu houby.

Mycelium ektomykorhizních hub také dokáže z půdy ke kořeni přivádět vodu, a tím půdu vysoušet. Na vlhkosti půdy však závisí rychlost mikrobiálních rozkladných procesů: při klesající vlhkosti klesá i rychlost rozkladu organických látek v půdě, což znamená, že by ektomykorhizní houby mohly také tímto způsobem obohacovat půdu o organickou hmotu – a tento jev byl skutečně pozorován (KOIDE & WU 2003).

Ektomykorhizní houby však také produkují do prostředí řadu hydrolytických enzymů, které se uplatňují při rozkladu organických látek. Tím se zásadně liší od arbuskulárních mykorhizních hub, u nichž je produkce těchto enzymů velmi omezená. Někdy se uvádí, že se ektomykorhizní houby od saprotrofních, dřevo rozkládajících hub liší tím, že neprodukují enzymy fenoloxidázy a peroxidázy, které se na rozkladu ligninových látek obsažených ve dřevní hmotě podílejí. Mycelium ektomykorhizních hub však v přítomnosti společenstva dalších půdních organizmů (např. v nádobových kulturách ektomykorhizních rostlin) poměrně často vykazuje významné aktivity různých enzymů a je vybaveno celou škálou genů zodpovědných za jejich produkci (BURKE & CAIRNEY 2002). Tyto enzymové aktivity se pak uplatňují při uvolňování minerálních živin vázaných v organické hmotě (odumřelé biomase, semenech) a jejich opětovném zpřístupnění hostitelské rostlině (TIBBETT & SANDERS 2002, BUEE et al. 2007).

Výsledný vliv ektomykorhizních hub na obsah organických látek v půdě tedy záleží na tom, zda převládá jejich podíl na rozkladu těchto látek, nebo zda se více uplatní obohacování prostředí organickými látkami přiváděnými do půdy myceliem z hostitelské rostliny. Tato otázka není uspokojivě vyřešena.

Pomocí polymorfizmu délek restričních fragmentů DNA bylo zjištěno, že jak saprotrofní, tak ektomykorhizní houby lze rozlišit do skupin podle toho, jaké půdní horizonty osidlují (DICKIE et al. 2002): houby specializované na vrstvu opadu (litter specialists), houby specializované na fermentační horizont F, na humusový horizont H, na hlubší horizonty i houby přítomné ve všech horizontech najednou. Například druh *Ramaria concolor* se vyskytoval výhradně ve vrstvě opadu *Pinus resinosa*, druhy *Scleroderma*

citrinum (pestřec obecný), *Clavulina cristata* (kuřátečko hřebenité) a *Cenococcum geophilum* se vyskytovaly ve všech horizontech a druh *Amanita rubescens* (muchomůrka růžovka) se vyskytoval v horizontu H a v hlubších půdních horizontech. Zejména druhy vyskytující se ve svrchních horizontech, bohatších organickými látkami, se pravděpodobně významně podílejí na rozkladu humusu. Nelze se totiž domnívat, že jejich výskyt v půdních prostorách bohatých organickou hmotou je náhodný, víme-li zároveň, že jsou často schopny i polosaprotrofní výživy, jak je dále zmíněno níže.

Předpokládá se, že mykorrhizní symbiózy ektomykorrhizního a erikoidního typu jsou charakteristické pro prostředí s pomalým obratem uhlíku (tj. pro prostředí s podmínkami, které nepodporují tvorbu a rozklad organických látek), zatímco arbuskulární mykorrhizní symbióza je charakteristická pro prostředí, kde je tento obrat rychlý (CORNELISSEN et al. 2001). Při hodnocení koloběhu uhlíku v ekosystému tedy může být hodnocení převažujícího typu mykorrhizní symbiózy být důležitým vodítkem. Souhlasí to se schematickou představou o tom, že arbuskulární mykorrhizní houby se vyskytují zejména na stanovištích, kde je hlavní humusovou formou mul, přičemž mul se vytváří v podmínkách rychlého vzniku i rozkladu půdní organické hmoty. Ostatní typy humusu jsou pak osidlovány ektomykorrhizními houbami a houbami erikoidního typu, vyzbrojenými enzymovým aparátem schopným fungovat i v nepříznivých podmínkách drsnějšího klimatu, a např. také extrémního pH.

Těsné spojení ektomykorrhizních hub s dynamikou půdní organické hmoty je v souladu s jejich značným saprotrofním potenciálem, který souvisí s jejich velmi často neustálenou nebo ostře nediferencovanou životní strategií. Ektomykorrhizní symbióza se nezávisle vyvinula v průběhu posledních 130–180 milionů let hned několikrát (možná mnohokrát) a zřejmě měla zásadní význam pro diverzifikaci jak hostitelských rostlin, tak i symbiotických hub. Důvody, které nás přesvědčují o vícenásobném vzniku ektomykorrhizní symbiózy, plynou ze studia genetické informace nesené jednotlivými recentními druhy nemykorrhizních a ektomykorrhizních stopkovýtrusých hub (HIBBETT et al. 2000). Nejstarší bazidiomycety žily podle těchto výsledků pravděpodobně saprotrofně a postupně se „učily“ žít v symbióze s rostlinami. Je ale velmi zajímavé, že často docházelo i k opačnému procesu: některé ektomykorrhizní bazidiomycety po určité době přešly zpět k saprotrofnímu způsobu výživy. Tento přechod od jednoho způsobu obživy ke druhému však nemusel být důsledný, houba se mohla zastavit „na půli cesty“ a mohla se žít polosaprotrofně, část výživy mohla získávat od hostitelské rostliny, část z organických látek v prostředí. Tento stav se odráží v relativně dobré schopnosti mnoha druhů ektomykorrhizních hub růst na umělých živných půdách i v nepřítomnosti hostitelské rostliny.

Je možné, že právě vznikající neustálený ektomykorrhizní vztah nemusí být vyvážený a houba může i poškozovat kořeny a působit jako parazit. Zdá se, že to je případ houby *Entoloma saepium*, která poškozuje kořenová pletiva hostitelské rostliny (růžotvaré dřeviny) včetně vrcholových meristémů (AGERER & WALLER 1993). Podobně se chová také závojenka podtrnka (*Entoloma clypeatum*), která také poškozuje meristém, její růst je však v kontaktu s kořenem omezen a hyfy degenerují (KOBAYASHI & HATANO 2001), snad vlivem obranných látek produkovaných kořenem. Makroskopicky se tato interakce projevuje mírným zduřením kořenových pletiv a shoduje se tedy v hrubých rysech s morfologií normální ektomykorrhizy.

Společenstvo ektomykorrhizních hub v lesním ekosystému

Typicky se na ploše lesa o velikosti 0,1 hektaru nachází několik desítek druhů ektomykorrhizních hub (BRUNS 1995, SRAATSMA et al. 2001). Protože jsou jednotlivé druhy hub rozloženy v prostoru nerovnoměrně, počet nalezených druhů na lokalitě velmi silně závisí na úsilí vynaloženém k jejich detekci (HORTON & BRUNS 2001). Například chceme-li zjistit na určité lokalitě co největší počet druhů ektomykorrhizních hub, můžeme se pokusit molekulárně-genetickými metodami analyzovat jednotlivé mykorrhizy. Protože se mycelium jednotlivých druhů vyskytuje v půdě mozaikovitě, lze předpokládat, že i kolonizace kořenů mykorrhizními houbami bude mozaikovitá, tzn. že různé mykorrhizy budou obsahovat houby různých druhů. Je proto třeba z lokality odebrat velké množství mykorrhiz a zjišťovat, jakými druhy hub jsou kolonizovány. Aby byla tímto způsobem zachycena většina druhů (např. 90 %), je třeba analyzovat molekulárně-genetickými metodami několik tisíc mykorrhiz (HORTON & BRUNS 2001, FEDERSOOR et al. 2003). Počet zachycených druhů s počtem vyhodnocených mykorrhiz nejprve strmě stoupá, posléze však roste jen velmi pomalu.

K podobným výsledkům dojdeme, pokud se budeme snažit zachytit co nejvíce typů mykorrhiz. Tvar mykorrhiz (morfortyp) se u jednotlivých druhů ektomykorrhizních hub poněkud liší, a morfo-

typová diverzita mykorhiz tedy do jisté míry vypovídá o diverzitě jejich společenstva. Chceme-li však zjistit, kolik morfotypů mykorhiz se na nějakém stanovišti vyskytuje, analyzujeme postupně mykorhizy z tohoto stanoviště. Zpočátku najdeme velké množství jejich typů. Když v práci pokračujeme, nově nalezených typů postupem času ubývá, protože čím více typů jsme už našli, tím větší máme jistotu, že každý další hodnocený typ už ze stanoviště známe, že se tedy jen opakuje. Postupně se tak počet nových typů přestává zvyšovat a námi zjištěný počet se blíží ke skutečnému počtu morfotypů na lokalitě. Potřebný počet analyzovaných mykorhiz jde v tomto případě také do tisíců (TAYLOR 2002).

Mozaikovitá struktura výskytu jednotlivých druhů hub na lokalitě je velmi jemná a velmi pravděpodobně mají při prolínání genetů jednotlivé části této mozaiky rozměry několika centimetrů (TEDERSOO et al. 2003).

Metodami molekulární identifikace druhů bylo zjištěno, že nejen že jeden a tentýž strom rostoucí v lese je obydlen mnoha druhy ektomykorhizních hub (např. GARDES & BRUNS 1996) ale také že v normálním půdním společenstvu ektomykorhizních hub nemusí nepřevládat jeden dominantní druh nad druhy ostatními dokonce ani v blízkosti plodnice jednoho z druhů (Zhou & Hogetsu 2002).

Biomasa mycelia ektomykorhizních hub v lesní půdě může nabývat značných hodnot, odhaduje se 800 kg mycelia/ha (WALLANDER et al. 2001) a může tvořit asi jednu třetinu celkové mikrobiální biomasy. Vzhledem k tomu, že do půdy rozvádí značné množství uhlíkatých látek z kořenů rostlin, může být důležitým faktorem ovlivňujícím koloběh zejména uhlíku v ekosystému.

Ekologické aspekty využití mykorhizních hub v praxi

Rozšíření mykorhizních hub je podrobena vlivu člověka zejména proto, že se je člověk pokouší využít ve svůj prospěch neboť některé vlastnosti mykorhizní symbiózy, která působením mykorhizních hub v ekosystému vznikne, vedou ke zlepšení růstu rostlin, ke zlepšení jejich zdravotního stavu i odolnosti ke škůdcům a konečně i ke zvýšení odolnosti k různým formám stresu vyvolaného prostředím. Mykorhizní houby jsou proto do různých rostlinných kultur introdukovány. Umělá introdukce mykorhizních hub do prostředí, kde tyto houby nejsou původní však může být z ekologického hlediska závažným jevem (WEIR 2007). Cestou této člověkem zprostředkované migrace (zavlékání) je jednak ničím nekontrolovaná a neomezovaná distribuce různých očkovacích přípravků, které mykorhizní houby obsahují, jednak introdukce sazenic jejich hostitelských rostlin do nových prostředí, kdy s rostlinami jsou přemísťovány nepozorovaně i jejich symbiotické houby. Zatím se tak děje až na výjimky (CHAPELA et al. 2001) bez závažnějších negativních důsledků, nebo nám tyto důsledky nejsou dosud známy. Migrace mykorhizních hub je prostudována nejlépe v případě hub ektomykorhizních (VELINGA et al. 2009). Domnívám se, že i tento aspekt zasluhuje pozornost odborné veřejnosti, zejména proto, že pravidla, kterými se řídí výskyt určitého druhu v prostředí i pravidla jeho chování v tomto prostředí nejsou až na několik málo výjimek známa. To znamená, že s mykorhizní symbiózou zacházíme v podstatě jako s černou skříňkou, o jejímž obsahu nemáme dosud dostatečně zřetelnou představu.

Citovaná literatura

- AGERER R. & WALLER J. 1993: Mycorrhizae of *Entoloma saepium*: parasitism or symbiosis? Mycorrhiza, 3: 145-154.
- DE BARY H.A. 1879: De la symbiose. Rev. Internat. des Sciences, 3: 301-309.
- BRUNS T.D. 1995: Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant Soil, 170: 63-73.
- BUEE M., COURTY P.E., MIGNOT D., GARBAYE, J. 2007: Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. Soil Biol. Biochem., 39: 1947-1955.
- BURKE R.M. & CAIRNEY J.W.G. 2002: Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 12: 105-116.

- CORNELISSEN J.H.C., AERTS R., CERABOLINI B., WERGER M.J.A., VAN DER HEIJDEN M.G.A. 2001: Carbon cycling traits of plant species are linked with mycorrhizal strategy. *Oecologia*, 129: 611–619.
- DICKIE I.A., XU B., KOIDE R.T. 2002: Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol.*, 156: 527–535.
- GARDES M. & BRUNS T.D. 1996: Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. *Can. J. Bot.*, 74: 1572–1583.
- GRYNDLER M., BALÁŽ M., HRŠELOVÁ H., JANSÁ J., VOSÁTKA M. 2004: Mykorhizní symbióza. O soužití hub s kořeny rostlin. Academia, Praha, 366 pp.
- HIBBETT D.S., GILBERT L.B., DONOGHUE M.J. 2000: Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature*, 407: 506–510.
- HORTON T. & BRUNS T. 2001: The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molec. Ecol.*, 10: 1855–1871.
- CHAPELA I.H., OSHER L.J., HORTON T R., HENN M.R. 2001: Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 1733–1740.
- JOHNSON D., LEAKE J. R., OSTLE N., INESON P., READ D.J. 2002: In situ ¹³C₂ pulse-labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil. *New Phytol.*, 153: 327–334.
- KOBAYASHI H & HATANO K. 2001: A morphological study of the mycorrhiza of *Entoloma clypeatum* f. *hybridum* on *Rosa multiflora*. *Mycoscience*, 42: 83-90.
- KOIDE R.T. & WU T. 2003: Ectomycorrhizas and retarded decomposition in a *Pinus resinosa* plantation. *New Phytol.*, 158: 401–407.
- LERAT S., GAUCI R., CATFORD J. G., VIERHEILIG H., PICHÉ Y., LAPOINTE L. 2002: ¹⁴C transfer between the spring ephemeral *Erythronium americanum* and sugar maple saplings via arbuscular mycorrhizal fungi in natural stands. *Oecologia*, 132: 181–187.
- MARGULIS L. 1999: *Symbiotic Planet: A New Look at Evolution*. Basic Books, New York, 176 pp.
- SEDDAS P.M.A., ARIAS C.M., ARNOULD C., VAN TUINEN D., GODFROY O., BENHASSOU H.A., GOUZY J., MORANDI D., DESSAINT F., GIANINAZZI-PEARSON V. 2009: Symbiosis-related plant genes modulate molecular responses in an arbuscular mycorrhizal fungus during early root interactions. *Molec. Plant Micr. Interact.* 22: 341-351.
- SMITH J.M. 1991: A darwinian view of symbiosis. pp. 26-39. In: MARGULIS L. & FESTER R. (eds.): *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. The MIT Press, Cambridge, USA.
- STRAATSMA G., AYER F., EGLI S. 2001: Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycol. Res.*, 105: 515–523.
- TAYLOR A.F.S. 2002: FUNGAL DIVERSITY IN ECTOMYCORRHIZAL COMMUNITIES: SAMPLING EFFORT AND SPECIES DETECTION. *PLANT SOIL*, 244: 19–28.
- TEDERSOO L., KÖLJALG U., HALLENBERG N., LARSSON K.H. 2003: FINE SCALE DISTRIBUTION OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND ROOTS ACROSS SUBSTRATE LAYERS INCLUDING COARSE WOODY DEBRIS IN A MIXED FOREST. *NEW PHYTOLOGICAL JOURNAL*, 159: 153–165.
- TIBBETT M. & SANDERS F.E. 2002: ECTOMYCORRHIZAL SYMBIOSIS CAN ENHANCE PLANT NUTRITION THROUGH IMPROVED ACCESS TO DISCRETE ORGANIC NUTRIENT PATCHES OF HIGH RESOURCE QUALITY. *ANNALS OF BOTANY*, 89: 783–789.
- VELLINGA E.C., WOLFE B.E., PRINGLE A. 2009: GLOBAL PATTERNS OF ECTOMYCORRHIZAL INTRODUCTIONS. *NEW PHYTOLOGICAL JOURNAL*, 181: 960–973.
- WALLANDER H., NILSSON L.O., HAGERBERG D., BAATH E. 2001: ESTIMATION OF THE BIOMASS AND SEASONAL GROWTH OF EXTERNAL MYCELIUM OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI IN THE FIELD. *NEW PHYTOLOGICAL JOURNAL*, 151: 753–760.
- WEIR, T.L. 2007: The role of allelopathy and mycorrhizal associations in biological invasions. *Allelopathy J.*, 20: 43-50.
- WU B., NARA K., HOGETSU T. 2002: Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. *Mycorrhiza*, 12: 83–88.
- ZHOU Z. & HOGETSU T. 2002: Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. *New Phytol.*, 154: 529–539.

Kontakt

Milan Gryndler

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

Vídeňská 1083, 14220, Praha 4

e-mail: gryndler@biomed.cas.cz

MIKORYZA W LEŚNICTWIE I MIKORYZACJA SADZONEK W PRAKTYCE

Kazimierz Szabla
Katowice, Polsko

Mikoryzacja sadzonek

Znaczenie mikoryzy w życiu lasu

Jednym z istotnych składników życia biologicznego gleb leśnych są grzyby, a wśród nich grupa tworząca związki symbiotyczne z drzewami leśnymi. Efektem tej symbiozy jest mikoryza, czyli wspólny organ złożony z grzyba i korzenia, tzw. grzybokorzeń. Związki te tworzone są z korzeniami ostatniego rzędu, czyli korzeniami krótkimi. Wyrastające z komórek skórki włosniki z chwilą wejścia korzeni w kontakt mikoryzowy zanikają, a ich funkcję przejmuje nowy organ zwany mikoryzą. W naturze występuje bardzo duża różnorodność form morfologicznych i anatomicznych mikoryzy. Charakterystyczne dla układu współżycia rośliny oraz grzyba cechy morfologiczne i anatomiczne stały się podstawą wyróżnienia trzech głównych typów mikoryzy: ektomikoryzy, endomikoryzy i ektendomikoryzy.

Dla drzew leśnych istotna jest ektomikoryza, czyli mikoryza zewnętrzna. W świecie roślin występuje zaledwie u około 10% roślin, lecz w leśnictwie odgrywa niezwykle ważną rolę, gdyż jest optymalną dla naszych drzew formą symbiozy. Strzępki grzyba wnikają pomiędzy ściany komórek miękiszu kory pierwotnej korzeni tworząc tzw. sieć Hartiga, ale nigdy nie przerastają komórek endodermy i nie wnikają do komórek walca osiowego. W rejonie sieci Hartiga następuje wymiana związków mineralnych i organicznych między obu symbiontami: grzyb przekazuje roślinie m.in. sole mineralne, wodę, hormony i witaminy, a otrzymuje od niej głównie cukry, których – z powodu braku chlorofilu – sam nie potrafi wytworzyć. Wokół korzeni krótkich, które uległy morfogenezie, tworzy się opilśnia (mufka grzybniowa). Strzępki grzyba wyrastają z powierzchni mikoryzy i przerastają środowisko glebowe, tworząc liczne rozgałęzienia – gęstą sieć. To one pobierają z gleby wodę i substancje pokarmowe, które sznurami grzybniowymi wędrują do rośliny.

W naszej strefie klimatycznej mikoryza ektotroficzna występuje naturalnie u wszystkich głównych gatunków lasotwórczych. Jest ona obligatoryjna w warunkach naturalnych i dla większości z nich ta forma symbiozy decyduje o życiu. Ektotroficzne (odżywiające się przy pomocy ektomikoryzy) są wszystkie gatunki z rodzaju *Pinus* (sosna), *Picea* (świerk), *Larix* (modrzew), *Abies* (jodła), *Pseudotsuga* (jedlica), *Tsuga* (choina), *Quercus* (dąb), *Fagus* (buk), czy *Carpinus* (grab). U innych gatunków drzew występować mogą obok ektomikoryzy inne formy symbiozy grzybowej. W dużym stopniu zależy to od warunków środowiska, w tym głównie żyzności gleby i dostępności pokarmu. Ektomikoryzę tworzą głównie grzyby należące do podgromady *Basidiomycotina* (podstawczaki), z rzędu *Agaricales*. Biologiczna niezbędność grzybów mikoryzowych we wzroście i rozwoju większości drzew leśnych jest zatem faktem.

Związki ektomikoryzowe drzew z grzybami są tworzone tym chętniej, im większe jest ubóstwo pokarmowe gleby. Warunkiem tworzenia mikoryzy jest odpowiedni dostęp światła oraz współdziałanie hormonów syntetyzowanych przez grzyby. Utarło się powiedzenie profesora Stefana Kowalskiego, że „grzyby mikoryzowe żywią i bronią”. Żywią, gdyż mają zdolność pobierania pokarmu zarówno ze związków organicznych, jak i nieorganicznych w glebie, niedostępnych dla korzeni autotroficznych. Przerastając zaś strzępkami grzybni glebę znacznie rozległej, niż uczynić to mogą korzenie drzew, pobierają sole mineralne. Strzępki w glebie, sznury grzybniowe oraz mufki grzybniowe wokół korzeni ostatniego rzędu, z uwagi na swoją gąbczastą budowę, magazynują sole mineralne, a także spore ilości wody, przez co łagodzą ujemny wpływ suszy.

Drzewa z mikoryzą uzyskują więcej soli mineralnych, a przez to są lepiej odżywione. Mikoryza stymuluje natężenie i przebieg asymilacji, z której produktów w części korzystają grzyby mikoryzowe.

Mikoryza, oprócz funkcji fizjologiczno-żywnościowych, chroni drzewa leśne przed grzybami i organizmami patogenicznymi, szczególnie tymi, które atakują systemy korzeniowe. Ochroną są mufki i opłisnie wokół korzeni krótkich. Mogą one także zwiększać odporność roślin na drodze biochemicznej, stymulując syntetyzowanie takich substancji chemicznych, jak na przykład związki fenolowe, czy fitoaleksyny, odpowiedzialne za kształtowanie się odporności roślin na choroby. Sama grzybnia może także wydzielać do gleby substancje biologicznie czynne o charakterze antybiotyków, hamujące wzrost lub likwidujące organizmy patogeniczne w pobliżu korzeni.

Związki symbiotyczne roślin z grzybami tworzą się w przyrodzie dynamicznie, podlegają ciągłym zmianom. O tym, który z grzybów nawiąże kontakt mikoryzowy, decyduje gatunek drzewa, faza rozwoju drzewostanu, a także siedlisko. Niektóre rodzaje, (*Boletus*, *Hebeloma*), a nawet gatunki grzybów, tworzą związki mikoryzowe z wieloma gatunkami drzew, inne wyspecjalizowały się w tworzeniu mikoryzy tylko z jednym gatunkiem (np. *Suillus grevillei* z modrzewiem, czy *Rhizopogon hteolus* z sosną). Garnitur grzybów mikoryzowych zmienia się także wraz z wiekiem drzewa. Inne gatunki grzybów tworzą mikoryzy z siewkami i sadzonkami, inne zaś z drzewami w fazie tyczkowiny, drągowiny, czy drzewostanów starszych.

Dla każdego gatunku drzewa, w powiązaniu z określonym środowiskiem (siedliskiem) można dziś ustalić garnitur grzybów, a także możliwe rodzaje mikoryzy. Wiedza ta jest przydatna w określeniu zagrożeń wynikających z wprowadzenia i hodowli drzew określonych gatunków w konkretnym środowisku, jak też w prognozowaniu, np. rozwoju sytuacji na terenach pod wieloletnim wpływem silnej antropopresji, w tym imisji przemysłowych. Może także posłużyć do podejmowania konkretnych decyzji gospodarczych. Wiedząc bowiem, że właściwym, genetycznie ukształtowanym sposobem odżywiania się drzew leśnych jest mikotroficzny, a nie autotroficzny sposób zdobywania pokarmu oraz że ektomikoryzy pełnią także wiele innych funkcji determinujących prawidłowy wzrost i rozwój drzew, można określić obszary w gospodarce leśnej, na których nie ma warunków zapewniających w miarę niezakłócony wzrost i rozwój drzew. Do takich obszarów należą:

- szkółki o długim i intensywnym okresie użytkowania,
- grunty porolne przeznaczone do zalesienia,
- nieużytki i gleby poprzemysłowe rekultywowane,
- gleby leśne zdegradowane emisjami przemysłowymi oraz przez wielkopowierzchniowe pożary itp.

Potrzeby mikoryzacji

Z badań wynika, że sadzonki, szczególnie drzew iglastych, hodowane w szkółkach gruntowych o wieloletnim okresie użytkowania, wykazują znaczne zakłócenia fizjologiczno-rozwojowe, spowodowane zanikiem grzybów ektomikoryzowych. Przyczyną jest, między innymi, zmiana chemizmu gleby (często jest nadmiernie alkaliczna), spowodowana nadmiernym nawożeniem, zwłaszcza związkami azotu, a także powszechnym stosowaniem środków ochrony roślin, zwłaszcza fungicydów i herbicydów. Używane bowiem w większych dawkach i z dużą częstotliwością, niszczą grzyby ektomikoryzowe. Brak zaś, odpowiedniego do fazy rozwoju i gatunku siewki, grzyba mikoryzowego powoduje dużą podatność sadzonek na choroby i konieczność coraz częstszego stosowania środków ochrony roślin oraz nawozów, co jeszcze bardziej degraduje glebę. Powstaje zatem zjawisko sprzężenia zwrotnego dodatniego (tzw. błędne koło).

W ostatnim stuleciu, na wielu kontynentach, a zwłaszcza w rejonach uprzemysłowionych, gwałtownie zaczęły nasilać się choroby lasu. Ogranicza to ich wielorakie funkcje, a nawet doprowadza do zniszczeń na dużych obszarach. Do głównych przyczyn tych zjawisk należy bez wątpienia degradacja biologiczna gleb, spowodowana emisjami do gleby wielu trujących związków oraz błędy w gospodarce leśnej. Jednym z istotnych skutków tej degradacji jest zniszczenie wielu, specyficznych dla gleb leśnych, składników jej życia, szczególnie grzybów symbiotycznych, warunkujących prawidłowe funkcjonowanie ekosystemów leśnych.

W celu zapobieżenia degradacji gleb leśnych konieczna jest hodowla sadzonek zaopatrzonych we właściwą mikoryzę. Będą one również niezbędne do efektywnego odnawiania i zalesiania stale zwiększającego się arealu gruntów leśnych zdegradowanych emisjami przemysłowymi, powierzchni poprzemysłowych, jak też zwiększającej się od kilkudziesięciu lat powierzchni pożar-

zysk, a także terenów wzdłuż autostrad. Sterowana zatem mikoryzacja nie jest celem samym w sobie, ale wynika z zapotrzebowania na silne sadzonki, dobrze rosnące w trudnych warunkach. Potrzeba mikoryzacji sadzonek drzew leśnych wynikają przede wszystkim z:

- przyrodzonych właściwości roślin drzewiastych do mikotroficznego, a nie autotroficznego, sposobu odżywiania, wykształconego przez trwający kilkaset milionów lat proces ewolucji;
- kształtowania predyspozycji chorobowej rośliny w stosunku do organizmów patogenicznych;
- różnorodnych zakłóceń mikrobiologicznych w miejscach hodowli materiału sadzeniowego, np. na szkółkach, gruntach porolnych, czy glebie zdegradowanej;
- zapewnienia optymalnych warunków wzrostu i rozwoju podstawowym gatunkom lasotwórczym w środowisku, w którym nie ma grzybów ektomikoryzowych.

Mikoryzowane sadzonki powinny być hodowane głównie na potrzeby zalesiania:

- gruntów porolnych, zwłaszcza długo i intensywnie użytkowanych;
- nieużytków, w tym szczególnie nieużytków przemysłowych;
- gleb rekultywowanych;
- gleb leśnych zdegradowanych przez emisje przemysłowe, pożary wielkopowierzchniowe lub wielopokoleniową niezgodność biocenozy z biotopem, w tym szczególnie na obszarach występowania huby korzeni *Heterobasidion annosum*, czy opieńki *Almillaria* spp.

Metody mikoryzacji

W mikoryzacji można wyróżnić metody oparte na stosowaniu naturalnego *inokulum* i metody mikoryzacji sterowanej. W pierwszym przypadku istota zabiegu polega na przeniesieniu nieznanego, ale prawdopodobnie zróżnicowanego pod względem ilościowym oraz jakościowym zbiorowiska grzybów mikoryzowych zasiedlających humus leśny do przygotowanego substratu hodowlanego. W drugim na wprowadzeniu do substratu hodowlanego ściśle określonej ilości *propagul* zidentyfikowanego i znanego grzyba mikoryzowego.

Metody mikoryzacji sterowanej

Stosowanie inokulum zawierającego zarodniki grzybów mikoryzowych. Do tego celu nadają się grzyby mikoryzowe, które wytwarzają dużą ilość zarodników. Należą do nich grzyby z rodzaju *Phisolithus* – purchatnica, *Scleroderma* – tęgoskór, czy *Rhizopogon* – piestrówka.

Pierwszym etapem wytwarzania *inokulum* jest zbiór owocników w stanie dojrzałości, ale jeszcze przed pęknięciem. Następnie trzeba je wysuszyć, zwykle w temperaturze około 20–25°C, przez około dwie doby, do wilgotności 8–10%. Zarodniki przechowuje się w szczelnych opakowaniach, w temperaturze 4–5°C. Samo *inokulum* może być sporządzane w różnych postaciach, zależnie od sposobu wprowadzania w środowisko ryzosfery i może mieć formę:

- stałą – zarodniki zmieszane z gliną, piaskiem, vermiculitem, a najlepiej z węglem drzewnym, który jest mikrobiologicznie czysty, a dodatkowo stymuluje kiełkowanie zarodników, i w tej postaci wprowadzane do substratu lub gleby;
- płynną – z zarodnikami zmieszany z wodą tuż przed zraszaniem substratu lub gleby (do wody należy dodać środek chemiczny, np. kilka kropli płynu do naczyń typu „Ludwik”, zmniejszający napięcie powierzchniowe i ułatwiający równomierne rozproszanie zarodników w wodzie).

Zarodniki mogą być też umieszczane przy użyciu lepiszcza bezpośrednio na nasionach przed ich wysiewem lub w formie zamkniętych otoczek z substancji koloidalnych i w tej postaci wprowadzane do gleby czy substratu.

Podstawowym gatunkiem grzyba, z którego zarodników sporządza się tam *inokulum* jest *Pisolithus tinctorius*, cechujący się znacznym zasięgiem geograficznym, współżyciem z wieloma gatunkami drzew w różnych fazach rozwoju i tolerancją na zmiany elementów środowiska. Zaletą „szczepionki zarodnikowej” jest głównie łatwość jej sporządzania i możliwość dłuższego przechowywania w odpowiednich warunkach. Wadą, między innymi, brak wpływu na regularność i obfitość pojawiania się owocników. W tej metodzie nie jesteśmy w stanie skutecznie kontrolować procesu mikoryzacji, więc udatność szczepień i stopień kolonizacji korzeni przez grzybnie trudno przewidzieć. Mankamentów tych nie ma następną metodą.

Stosowanie *inokulum* wegetatywnego z żywą grzybnią grzyba ektomikoryzowego.

Wprowadza się je najczęściej do podłoża lub substratu tuż przed siewem lub szkółkowaniem. Stosowanie *inokulum* wegetatywnego, rozpowszechnione w kilku krajach, daje najlepsze efekty. Zanim jednak rozpocznie się jego masową produkcję, należy wyselekcjonować odpowiedni szczep grzyba mikoryzowego, biorąc pod uwagę takie jego cechy mikoryzogenne, jak: tempo nawiązywania kontaktu z rośliną, stopień mikoryzowania systemu korzeniowego, budowę sieci Hartiga, grubość mufki grzybniowej, wpływ na wzrost i rozwój rośliny w fazie młodocianej, a także aktywność antagonistyczną do grzybów patogenicznych i tolerancję na środki chemiczne, skażenie gleb oraz na zróżnicowanie pH roztworów glebowych. Nie bez znaczenia są też: żywotność grzybni, łatwość rozmnażania i zdolność tworzenia mikoryzy z wieloma gatunkami drzew. Cechy decydujące o zgodności szczepu grzyba ze środowiskiem mają w dalszym życiu sadzonki podstawowe znaczenie. Sprawdzianem wartości tak zmikoryzowanych sadzonek w końcowej ocenie będą efekty hodowlane uzyskiwane na uprawach z nich założonych, w porównaniu z sadzonkami niemikoryzowanymi lub z mikoryzą przypadkową.

W produkcji biopreparatów grzybów mikoryzowych wyróżnia się dwa etapy. Etap pierwszy (wg S. Kowalskiego) obejmuje wszystkie omówione już elementy w następującej kolejności:

- a. izolacje czystych kultur grzybów ektomikoryzowych z owocników lub zarodników, zależnie od gatunku grzyba;
- b. hodowlę grzybni na pożywkach syntetycznych, które stanowią materiał do dalszych badań, mających za cel:
 - określenie optymalnych warunków hodowli poszczególnych gatunków grzybów,
 - określenie aktywności mikoryzogennej wyizolowanych szczepów wobec poszczególnych gatunków drzew,
 - określenie trwałości hodowli,
 - określenie zakresu możliwości stosowania poszczególnych szczepów grzybów i ich aktywności w stosunku do gatunków i fazy rozwojowej drzew,
 - określenie interakcji wybranych szczepów grzybów ektomikoryzowych w stosunku do wybranych grzybów patogenicznych,
 - określenie stopnia tolerancji grzybów ektomikoryzowych i ektomikoryz w stosunku do głównych polutantów w ogóle lub w stosunku do konkretnych związków toksycznych we wskazanych glebach, szczególnie w miejscach, w których mikoryzowane sadzonki będą posadzone.

Tak więc określenie zgodności wyselekcjonowanych grzybów z siedliskiem, do którego wprowadzane będą mikoryzowane sadzonki, jest bardzo ważne. Dopiero tak wyselekcjonowane szczepy grzybów ektomikoryzowych mogą być zastosowane w drugim etapie, który obejmuje:

- a. hodowlę dużej masy grzybni w jak najkrótszym czasie i jak najniższym kosztem,
- b. przygotowanie odpowiedniej formy biopreparatu.

Do sterowanej mikoryzacji sadzonek stosuje się, oczywiście, te gatunki grzybów, których przyrodzoną cechą są związki symbiotyczne z wczesnymi stadiami rozwojowymi drzew. Do takich grzybów należą: *Amanita muscaria* – muchomor czerwony, *Cenococcum geophilium* – czerniak pospolity, *Hebeloma crustuliniforme* – włośnianka rosista, *Laccaria bicolor* – lakówka dwubarwna, *Laccaria laccata* – lakówka pospolita, *Pisolithus arhizus* – purchatnica piaskowa, *Rhizopogon ro-*

seolus – piestrówka różowa, *Scleroderma citrinum* – tęgoskór pospolity, *Suillus bovinus* – maślak sitarz, *Suillus collinitus* – maślak rdzawobrzązowy, oraz inne.

W Polsce do masowego wytwarzania biopreparatów grzybów ektomikoryzowych używa się obecnie szczepów grzyba *Laccaria laccata*, *Laccaria bicolor* i *Hebeloma crustuliniforme*. Testowane są również biopreparaty z innymi gatunkami grzybów.

Postęp badań, głównie w Katedrze Fitopatologii Leśnej UR w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Stefana Kowalskiego, nad wprowadzeniem do praktyki leśnej biopreparatów z innymi gatunkami grzybów oraz szczepami tych gatunków dostosowanymi do miejsca sadzenia oraz tolerancji na różne czynniki stresujące, jest obiecujący. Pozwala to założyć, że w najbliższych latach PGL Lasy Państwowe będą w posiadaniu technologii umożliwiających wielokrotnienie produkcji biopreparatów o większej różnorodności gatunkowej i szczepowej. Równolegle w kilku ośrodkach naukowych bada się w ryzosferze towarzyszące mikoryzom bakterie, inicjujące powstanie i stymulujące rozwój mikoryzy. Wspomagają one mikoryzę i potocznie są nazywane „helperami” (z angielskiego mycorrhizal helper bacteria – MHB). Helpery są specyficzne i selektywne dla określonego rodzaju grzyba, a nie rośliny. Z dotychczasowych badań wynika, że bakterie te mają duży wpływ na aktywność korzenia i jego przygotowanie na przyjęcie symbionta grzybowego oraz utworzenie mikoryzy. Przy ich udziale odbywa się proces doboru (rozpoznania) między rośliną i grzybem. Jest to pierwszy, bardzo istotny etap procesu, prowadzący do symbiozy.

Zastosowanie bakterii typu MHB w wytwarzaniu i przygotowywaniu do użycia biopreparatów mikoryzowych z żywą grzybnią wegetatywną mogłoby mieć ważne znaczenie w praktyce leśnej.

Zarys technologii mikoryzacji sterowanej oraz podstawowe różnice w hodowli niemikoryzowanych i mikoryzowanych sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym

Szkółkarstwo kontenerowe otworzyło w Polsce drogę wdrożeniu technik i technologii szczepień sadzonek drzew leśnych biopreparatami mikoryzowymi. Dalszym, już rozpoczętym, etapem jest praktyczna i na dużą skalę uruchomiona hodowla mikoryzowanego materiału sadzeniowego.

W polskim leśnictwie na skalę gospodarczą stosowano dotychczas głównie biopreparaty z żywą grzybnią wegetatywną na bazie grzyba *Laccaria bicolor* oraz biopreparat z grzybem *Hebeloma crustuliniforme*. Testowane były też biopreparaty innych gatunków grzybów, które w najbliższym czasie zostaną wprowadzone do produkcji. Technologie mikoryzacji sadzonek w obu przypadkach, tj. zarówno przy użyciu biopreparatu z grzybem *Laccaria*, jak i *Hebeloma*, zostały dostosowane do technologii i cyklu hodowli sadzonek w szkółce kontenerowej. Biopreparat dodawany jest w odpowiedniej proporcji do substratu bezpośrednio przed napełnianiem i obsiewem kontenerów. Podjęto również próby hodowli sadzonek mikoryzowanych w różnego typu pojemnikach poza szkółkami kontenerowymi oraz szczepień mikoryzowych w inspektach, skrzyniach, tunelach foliowych i szklarniach. Pierwsze tego typu próby dały pozytywny wynik. Wysoki procent zmikoryzowania sadzonek oraz stopień zmikoryzowania systemu korzeniowego, zależy w dużym stopniu od:

- utrzymania odpowiednich, ściśle założonych reżimów sanitarnych i technologicznych;
- odpowiedniej jakości oraz składu substratu hodowlanego, a szczególnie jego czystości mikrobiologicznej, pojemności powietrznej i wodnej oraz pH;
- terminu siewu, który jest zarazem terminem wprowadzania biopreparatu do substratu hodowlanego;
- właściwego nawożenia mineralnego;
- odpowiedniego nawadniania i utrzymania optimum temperatury, zwłaszcza w początkowej fazie hodowli sadzonek.

Do hodowli sadzonek mikoryzowanych używa się sterylizowanego torfu o ściśle określonych właściwościach (niski stopień rozkładu, wysoka pojemność wodna i powietrzna, stałe pH na poziomie 4,5). Jest to zatem torf zalecany do szkółek kontenerowych. W celu poprawy pojemności wodnej i powietrznej do surowego torfu dodaje się około 10% wermikulitu (dodatkowe 5% wpro-

wadzane jest wraz z biopreparatem), a także perlit. Vermikulit, dzięki swojej płytkowej strukturze i właściwościom fizycznym poprawia warunki rozwoju grzybni. Strzępki grzybni dobrze rozwijają się pomiędzy płytkami wermikulitu. Proporcje torfu oraz pozostałych komponentów substratu muszą być na bieżąco ustalane i monitorowane. Zalecany poziom kwasowości substratu to 4,5–5,0 pH. Poziom kwasowości substratu hodowlanego musi być systematycznie kontrolowany. Kwasowość substratu powinna przede wszystkim odpowiadać wymaganiom gatunku drzewa poddanego zabiegowi sterowanej mikoryzacji (Kowalski i inni, 2007). Stosowany w Nadleśnictwie Rudy Raciborskie, do produkcji substratu torf z torfowisk wysokich w Estonii jest wolny od zarodników grzybów patogenicznych i może być używany do hodowli sadzonek mikoryzowanych grzybami z rodzaju *Hebeloma sp.* bez sterylizacji torfu parą wodną. Ważnym zagadnieniem jest nawożenie siewek poddanych mikoryzacji. Grzyby ektomikoryzowe, na początkowym etapie rozwoju symbiozy, są wrażliwe na wysoką zawartość związków azotowych. Hodowla siewek zmikoryzowanych wymaga specjalnego nawożenia przy użyciu nawozów wolno działających o przedłużonym okresie uwalniania związków mineralnych. Szczególnie ważne jest zachowanie odpowiednich proporcji pomiędzy składnikami nawozu i ich właściwe dawkowanie przez cały okres wegetacyjny. W przypadku stwierdzenia niedoboru składników mineralnych, objawiającego się chlorozą aparatu asymilacyjnego, konieczne jest zastosowanie nawożenia płynnego – dolistnego nawozem o odpowiednim składzie. Przy uzupełniającym nawożeniu dolistnym należy stosować małą koncentrację nawozu tak, aby roztwór nawozu nie przekraczał konduktywności 10 μ S. Przy nawożeniu roztworem nawozu o konduktywności 0,6–0,8 μ S zabieg powinien być powtarzany co 3–5 dni. Należy pamiętać, że częstotliwość i intensywność nawożenia zależy nie tylko od stadium rozwojowego siewek, ale także warunków pogodowych. Wysoka temperatura, częste nawadnianie bądź opady deszczu przyspieszają wymywanie nawozów z bryły korzeniowej. Ważnym elementem jest utrzymanie odpowiedniej wilgotności substratu hodowlanego. Szczegółowe warunki i zalecenia ujęte są w instrukcji, objętej klauzulą poufności. Personel w każdej szkółce, w której będzie rozpoczynana hodowla sadzonek mikoryzowanych, musi być odpowiednio przeszkolony.

Produkcja sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym w Polsce prowadzona jest w 7 szkółkach kontenerowych należących do Lasów Państwowych. W roku 2008 rozmiar hodowli sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym głównych gatunków lasotwórczych w szkółkach kontenerowych wynosił ogółem ponad 20,2 mln szt., w tym 10 mln szt. mikoryzowanych.

W 2008 roku koszty mikoryzacji grzybem *H. crustuliniforme* według technologii prof. SW. Kowalskiego wynosiły średnio 0,10 zł na jedną sadzonkę. Z wyhodowanych dotąd sadzonek zmikoryzowanych w nadleśnictwach: Rudy Raciborskie, Świerklaniec i Chrzanów (RDLP Katowice) założone zostały uprawy porównawcze na glebach o różnym stopniu degradacji oraz gruntach porolnych. Wyniki tych badań zostały opublikowane (Szabla, 2005).

Należy mieć świadomość, że mikoryzacja sadzonek nie jest lekarstwem na wszystkie problemy związane z degradacją gleb leśnych oraz zalesianiem gruntów porolnych, zwłaszcza wobec olbrzymiego bogactwa gatunkowego w środowisku naturalnym i złożoności życia biologicznego gleb oraz wzajemnych zależności organizmów. W naturalnych warunkach uczestniczą one aktywnie w obiegu materii i żyją we względnej równowadze, a przez to wpływają na zdrowie lasu. Przy wszelkiej zatem ingerencji w środowisko należy przewidywać możliwe skutki i mieć świadomość występowania zaburzeń w tak złożonym układzie, jakim jest środowisko leśne. Jednak ingerencja ta już nastąpiła i stwarza wiele problemów w zagospodarowaniu powierzchni z glebami w różnym stopniu zdegradowanymi. Wszędzie zatem tam, gdzie organizmy glebowe, warunkujące prawidłowe funkcjonowanie sadzonek, zostały zniszczone, zainicjowanie mikoryzacji sterowanej jest pożądane i korzystne, a często wręcz niezbędne do uzyskania pozytywnych rezultatów hodowlanych.

Wyniki hodowlane z upraw doświadczalnych, zakładanych z sadzonek z odkrytym i zakrytym systemem korzeniowym, wyhodowanych różnymi technikami.

Do początków lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku w Lasach Państwowych w ponad 99% hodowano sadzonki w szkółkach gruntowych. Hodowla sadzonek w pojemnikach miała miejsce na niewielką skalę. Po wdrożeniu w 1998 roku w szkółce kontenerowej w Nadleśnictwie Rudy Raciborskie do praktyki leśnej technologii sterowanej mikoryzacji sadzonek, w 1999 roku rozpo-

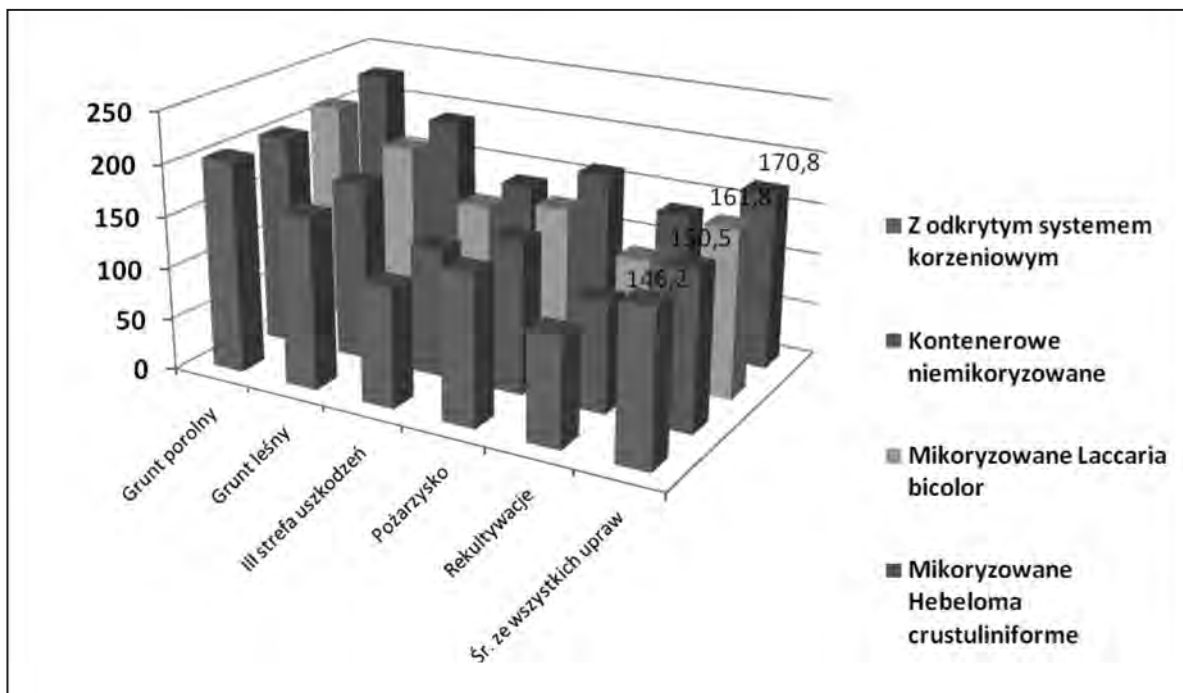
często badania w tym zakresie (Szabla). W okresie od 1999 do 2002 roku założono ponad 20 upraw doświadczalnych w różnych warunkach siedliskowych, a mianowicie na:

- zrębach w I i II strefie uszkodzeń przemysłowych,
- powierzchniach leśnych w II i III strefie uszkodzeń przemysłowych,
- powierzchniach leśnych o dużym stopniu degradacji imisjami przemysłowymi w V strefie uszkodzeń przemysłowych,
- powierzchniach leśnych po całkowitych pożarach,
- gruntach rekultywowanych po wyrobiskach piasków,
- gruntach porolnych.

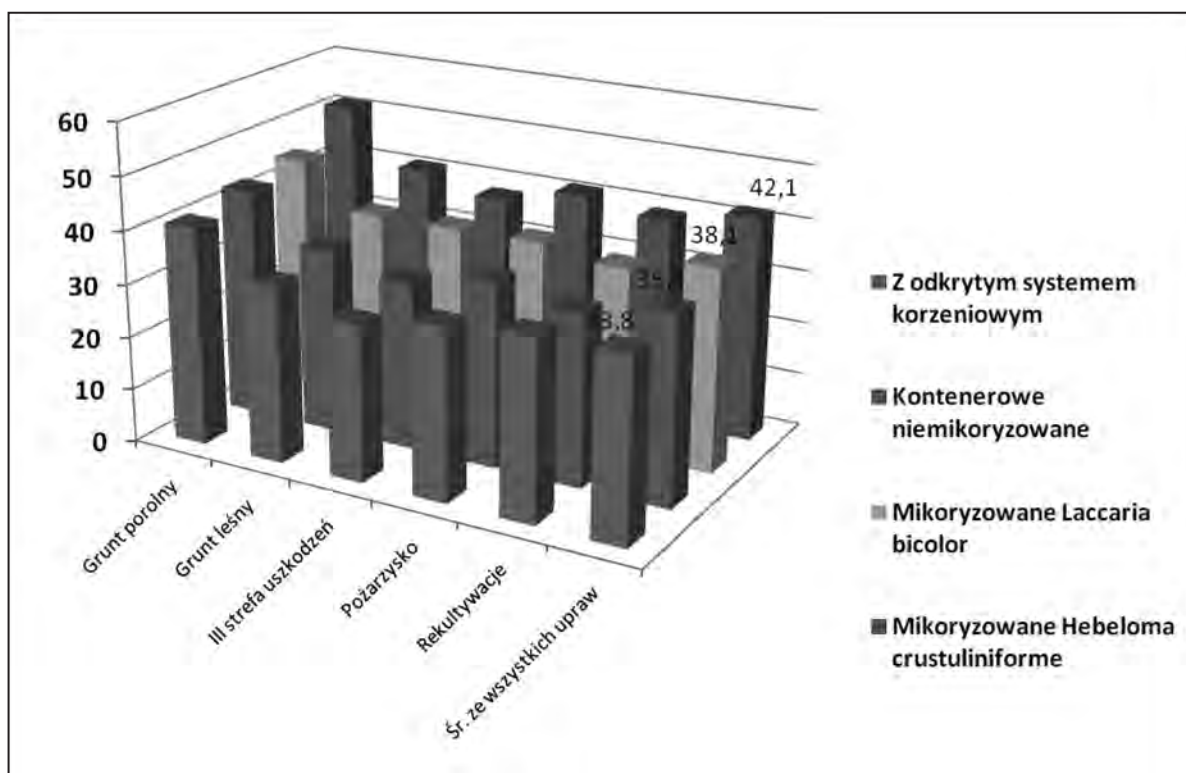
Badania prowadzono przez 5 lat na każdej uprawie. Corocznie, po zakończeniu okresu wegetacyjnego, mierzono i oceniano m.in. takie cechy jak: przyrost wysokości sadzonek, przyrost grubości w szyi korzeniowej, sumę przyrostu pędów bocznych ostatniego okółka u sosny oraz przeżywalność sadzonek w uprawach w różnych kombinacjach doświadczalnych. Szczegółowe wyniki badań opublikowane zostały w 2007 r., w podręczniku „Ektomikoryzy – Nowe biotechnologie w szkółkarstwie leśnym”. Z badań tych wynika, że sadzonki z zakrytym systemem korzeniowym wszystkich badanych gatunków, z wyjątkiem brzozy brodawkowatej, wykazywały większy przyrost zarówno wysokości jak i grubości w szyi korzeniowej, a różnice te, zwłaszcza w pierwszych trzech latach od wysadzenia, sięgały 50 i więcej procent. Sadzonki z zakrytym systemem korzeniowym w uprawach były zdrowsze, wyraźnie lepiej odżywione (zwłaszcza mikoryzowane), dynamiczne i żywotne. Zgryzane przez zwierzynę płową zdecydowanie lepiej się regenerowały. Przeżywalność w uprawach sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym wszystkich badanych gatunków w różnych warunkach środowiskowych była przeciętnie od 18 do 25% większa od sadzonek z odkrytym systemem korzeniowym ze szkółek gruntowych. Największą przeżywalnością na wszystkich uprawach cechowały się sadzonki mikoryzowane grzybem *Hebeloma crustuliniforme*. Po 5 latach maksymalne wypady sadzonek szczepionych tym grzybem nie przekraczały 5–9% i były średnio o 5% mniejsze niż u sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym niemikoryzowanych. Tak więc przeżywalność sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym niepoddanych zabiegowi sterowanej mikoryzacji była średnio o 20–25% większa, a mikoryzowanych średnio o blisko 30% większa od sadzonek wysadzonych w uprawy z nagim systemem korzeniowym u wszystkich badanych gatunków z wyjątkiem brzozy. Na powierzchniach szczególnie trudnych, zwłaszcza zdegradowanych imisjami przemysłowymi czy rekultywowanych po eksploatacji kopalni, różnica w przeżywalności po 5 latach sięgała nawet 50 i więcej procent na korzyść mikoryzowanych sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym. Badania potwierdziły zatem szczególną przydatność sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym w trudnych warunkach glebowych. Wykazały także, że mikoryzacja sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym miała istotny wpływ na różnicowanie się parametrów wzrostowych i żywotności sadzonek w uprawach. Sadzonki sosny, dębu oraz buka, szczepione grzybami mikoryzowanymi, w każdym warunkach środowiskowych i na każdym etapie wzrostu w uprawach osiągały wyższe przyrosty na wysokość, a także grubość szyi korzeniowej.

Największe różnice w przyrostach występowały w pierwszych trzech latach i w przypadku sosny przyrost na wysokość był często ponad dwukrotnie większy u sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym mikoryzowanych, niż u sadzonek z odkrytym systemem korzeniowym. Zdecydowanie lepsze rezultaty w rozwoju i przeżywalności w uprawach środowiskowych uzyskiwały sadzonki mikoryzowane polskim biopreparatem z grzybem *Hebeloma crustuliniforme*. Istotnych różnic w przyrostach pomiędzy sadzonkami z odkrytym i zakrytym systemem korzeniowym, zarówno mikoryzowanych jak i niemikoryzowanych, nie stwierdzono jedynie u sadzonek brzozy brodawkowatej. Wyniki badań pokrywają się z oceną nadleśnictw stosujących na większą skalę sadzonki ze szkółek kontenerowych. Potwierdzeniem efektów stosowania mikoryzowanych sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym są wyniki z ocen 10-letnich upraw w Nadleśnictwie Rudy Raciborskie, na których w ostatnich dziesięciu latach wysadzono ponad 10 mln sadzonek z zakrytym systemem korzeniowym, w znacznym procencie mikoryzowanych. Rozmiar poprawek w tym nadleśnictwie nie przekracza 2% powierzchni upraw.

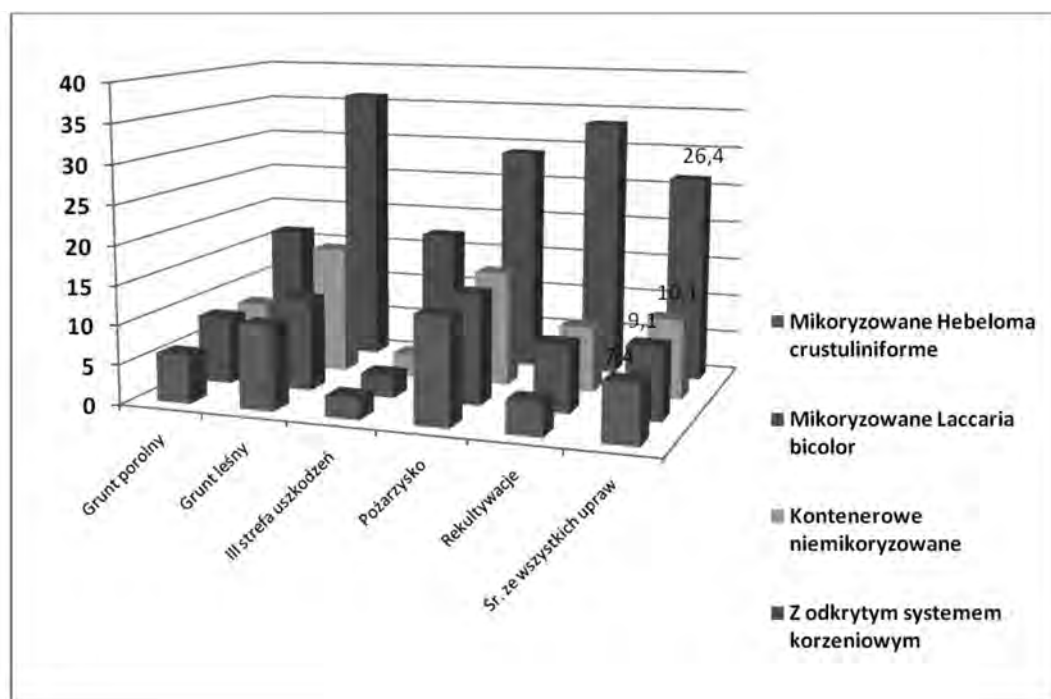
Podsumowanie wyników badań przedstawiają poniższe ryciny.



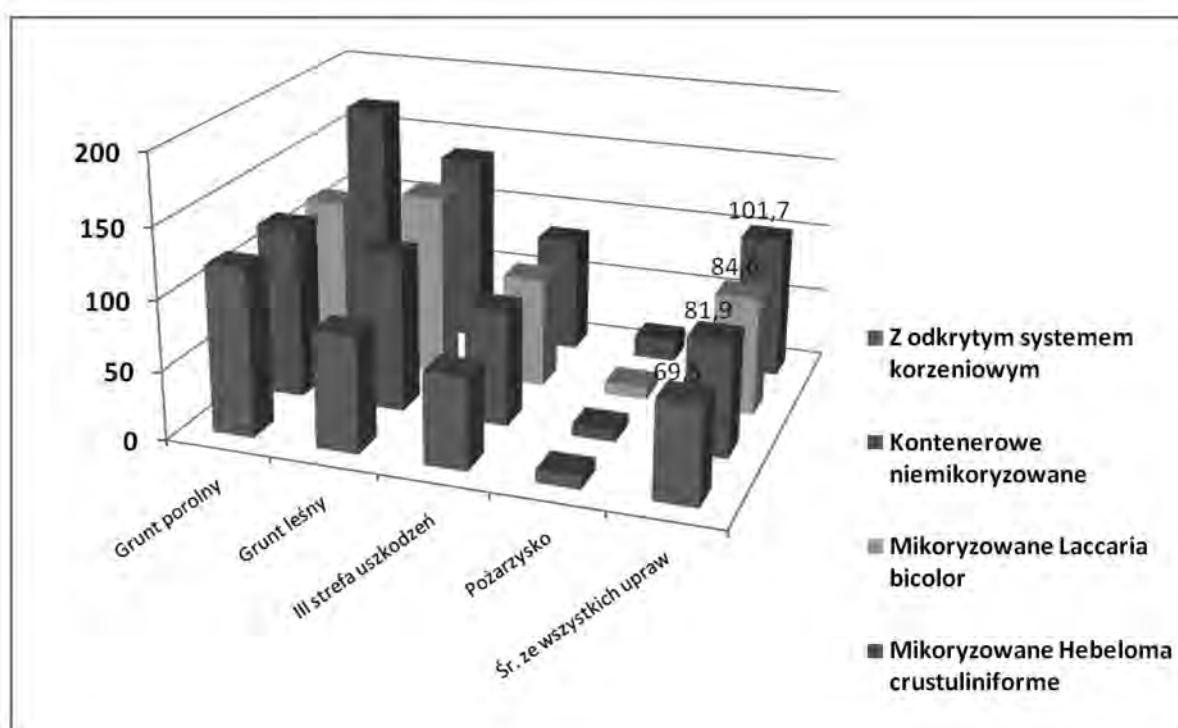
Ryc. 1: Średni przyrost wysokości (cm) 5 letnich sadzonek sosny w poszczególnych grupach upraw w zależności od kategorii gruntu.



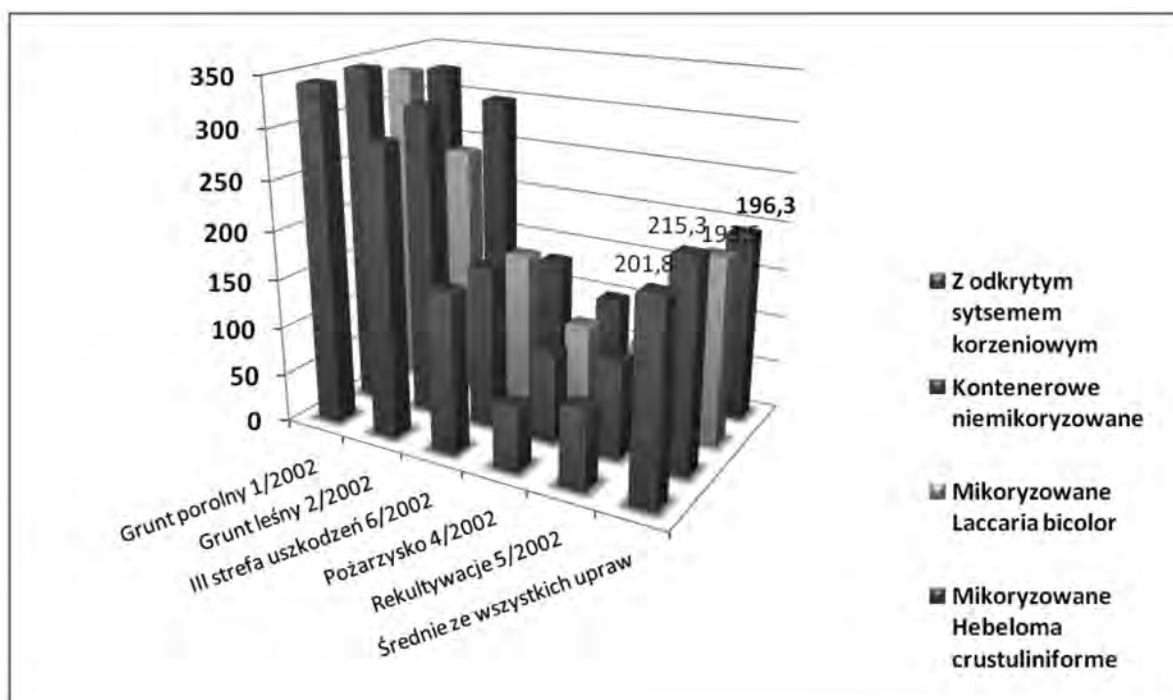
Ryc. 2: Średni przyrost średnicy szyi korzeniowej (mm) 5 letnich sadzonek sosny w poszczególnych grupach upraw w zależności od kategorii gruntu.



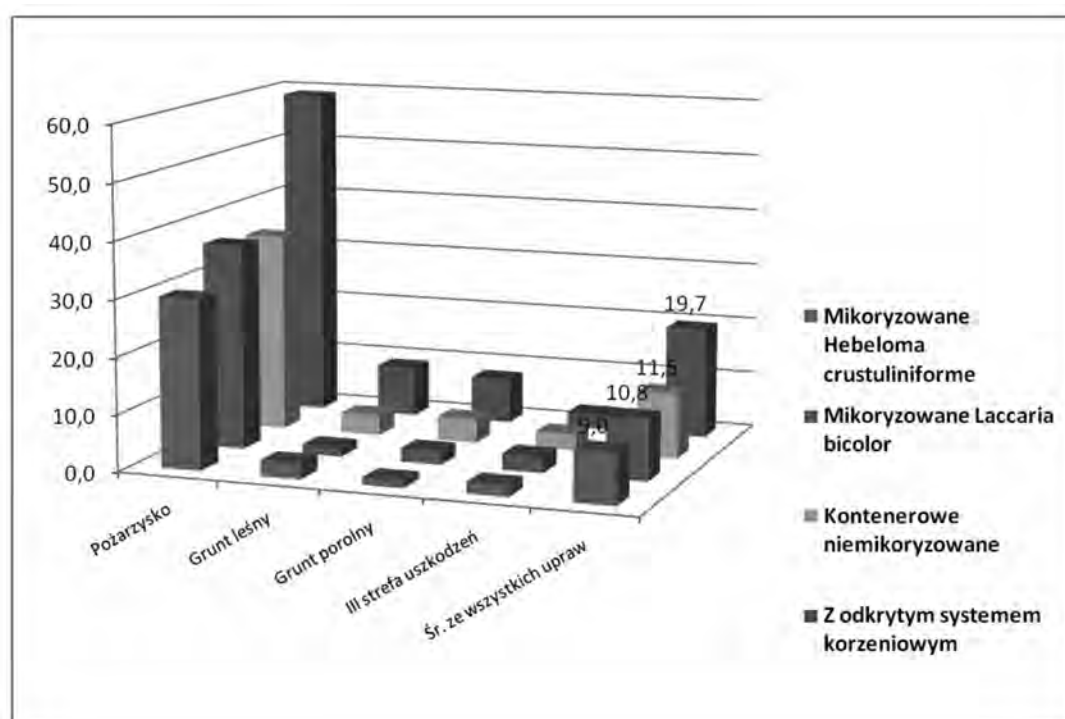
Ryc. 3: Wypadki po pięciu latach (%) sadzonek sosny w poszczególnych grupach upraw w zależności od kategorii gruntu.



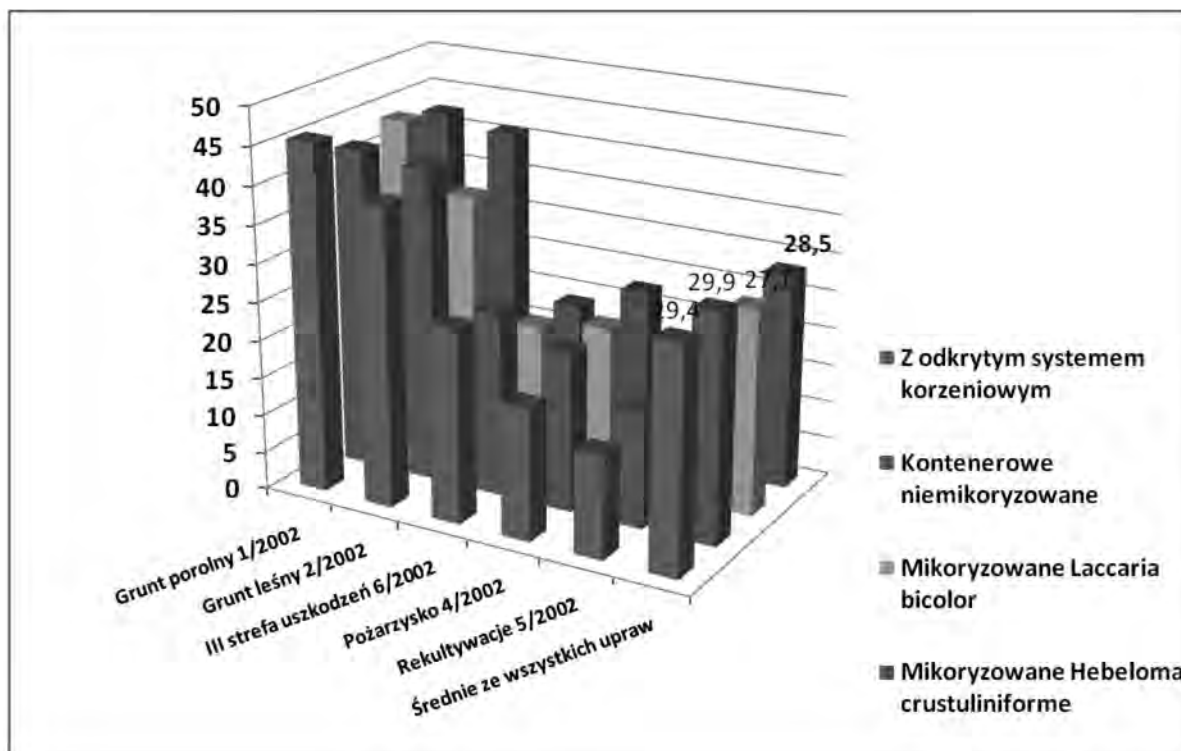
Ryc. 4: Średni przyrost wysokości (cm) pięcioletnich sadzonek dębu szypułkowego w poszczególnych grupach upraw z lat 1999-2002 w zależności od kategorii gruntu.



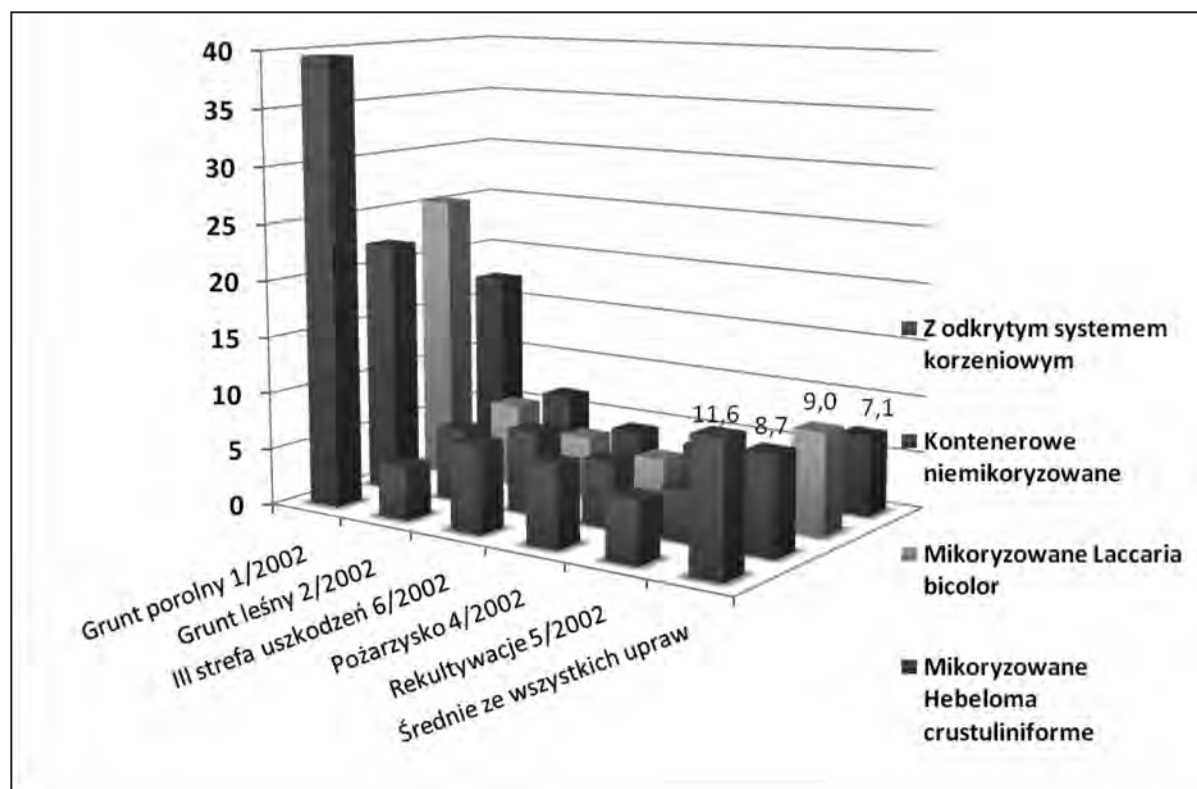
Ryc. 5: Średni przyrost średnicy szyi korzeniowej (mm) pięcioletnich sadzonek dębu szypułkowego w poszczególnych grupach upraw z lat 1999-2002 w zależności od kategorii gruntu.



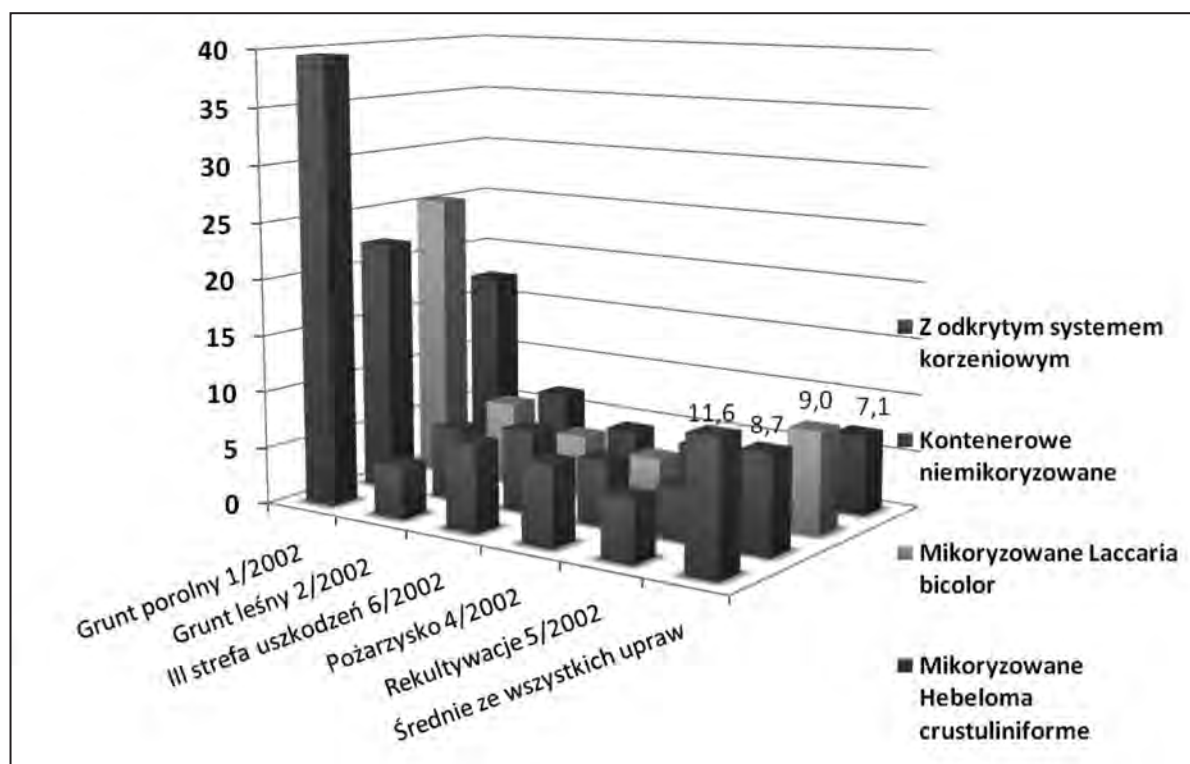
Ryc. 6: Wypadki po pięciu latach (%) sadzonek dębu szypułkowego w poszczególnych grupach upraw w zależności od kategorii gruntu.



Ryc. 7: Średni przyrost wysokości sadzonek brzozy brodawkowatej w uprawach na różnych kategoriach gruntów po pięciu latach [cm].



Ryc. 8: Średni przyrost średnicy w szyi korzeniowej (mm) pięcioletnich sadzonek brzozy brodawkowatej w poszczególnych grupach upraw w zależności od kategorii gruntu.



Ryc. 9: Wypadki po pięciu latach (%) sadzonek brzozy brodawkowatej w poszczególnych grupach upraw w zależności od kategorii gruntu.

Kontakt

Kazimierz Szabla
 ul. Św. Huberta 43/45, 40-543 Katowice, Polska,
 e-mail: sekretariat@katowice.lasy.gov.pl

EKTOMYKORHIZNÍ POMĚRY přirozených smrčín Krkonoš (výskyt plodnic, morfologie ektomykorhiz, molekulárně-biologické analýzy)

Filip Holub^{1,2}, Miloň Dvořák¹, Pavel Cudlín², Ewa Chmelíková²

¹Ústav ochrany lesů a myslivosti, LDF MZLU v Brně

²Ústav systémové biologie a ekologie, AV ČR, v.v.i.

Úvod

Krkonošské horské přirozené smrčiny byly v minulosti vystaveny silné imisní zátěží. V posledním době došlo sice k výrazné redukci depozice sirných sloučenin, ale depozice oxidů dusíku stále působí významnou acidifikaci půdy. V podmínkách očekávané změny klimatu by proto mohlo docházet ke stále výraznějšímu negativnímu působení na biodiverzitu ekosystému. Cílem práce je informovat o výsledcích průzkumu biodiverzity ektomykorhiz (ECM) v přirozeném smrkovém horském lese, vylíšit jednotlivé typy ECM na základě jednoduše pozorovatelných morfologických znaků, nalézt souvislosti mezi stavem lesního ekosystému a biodiverzitou ECM a pro jednotlivé typy ECM identifikovat symbiotické druhy ECM hub.

Metodika

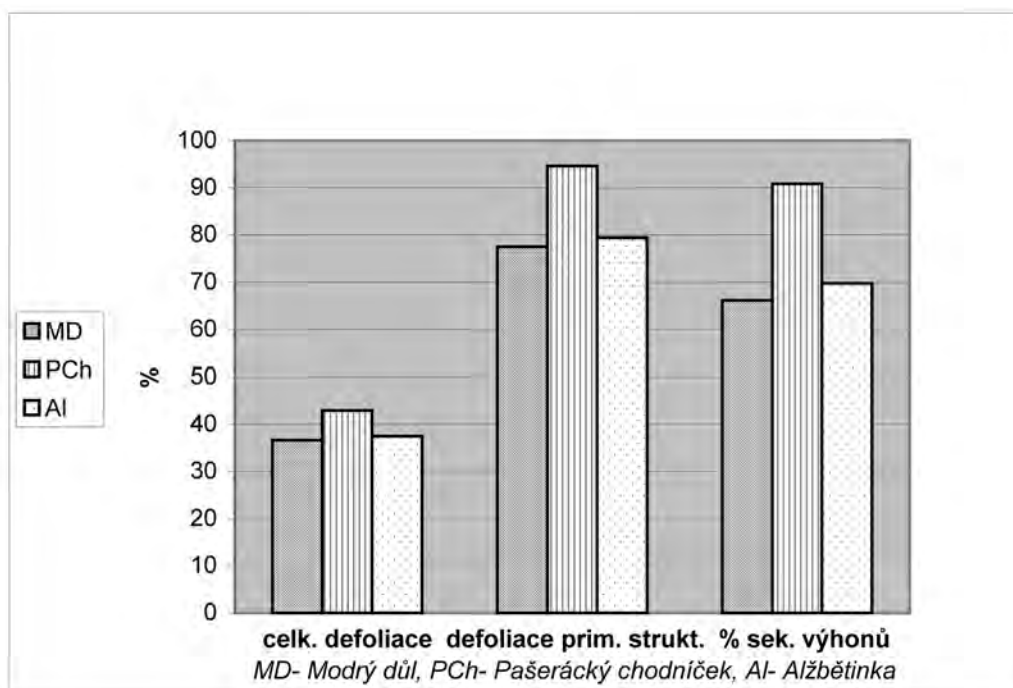
Charakteristika stanovišť

Průzkum plodnic a ECM byl prováděn na trvalých výzkumných plochách (TVP) Mumlavská hora, Alžbětinka, Pašerácký chodníček a Modrý důl o velikosti 50 x 50 m. ECM se odebíraly opakovaně na podzim 2007, v září 2008 a v říjnu 2009.

Klimatologicky spadají TVP do chladné klimatické jednotky CH 4 (QUITT 1970 ex BOHMANOVÁ 1992). Fytocenologicky je řazena většina ploch do společenstev kyselých smrčín asociace *Calamagristio villosae- Picetum* (HARTMAN 1953 ex BOHMANOVÁ 1992). Více informací o přírodních podmínkách na TVP je uvedeno v Tab.1.

Tab. 1: Přírodní podmínky

TVP	Nadmořská výška (m)	Orientace	Sklon svahu (°)	Matečná hornina	Půdní typ	Stáří porostu (roky)	Zápoj korun (1992→ 2000)
Mumlavská hora	1185	JZ	5	Žula	rašelinový, humusový podzol	180	0,01
Alžbětinka	1192	SZ	14	Žula	humusový podzol	213	0,35→0,2 9
Modrý důl	1237	J	22	Rula	mezotrofní kryptopodz ol	134	0,65→0,5 4
Pašerácký chodníček	1317	JZ	18	Svor	humus. podzol, podzol. ranker	158	0,50→0,3 1



Obr. 1: Celková defoliace, defoliace primární struktury a procento zastoupení sekundárních výhonů (Vávrová et al. 2007).

Zdravotní stav stromů byl charakterizován defoliací, procentuálním zastoupením sekundárních výhonů a stupněm transformace (POLÁK a kol. 2007). Stav na jednotlivých plochách ukazuje obr. 1.

Identifikace plodnic

Identifikace plodnic je prováděna na všech čtyřech plochách již od roku 1992. Plodnice byly určovány na místě Ing. E. Chmelíkovou nebo byly převáženy k určení Mgr. M. Beranovi. Při převozu byly umístěny v chladícím boxu s rašeliníkem.

Morfologická klasifikace ektomykorhiz

ECM byly určovány metodou morfologické klasifikace, která vychází z DEEMY od autorů AGERER & RAMBOLD (2004-2008). Z DEEMY byla použita morfologická část, ze které byly vybrány následující znaky: typ větvení, hustota špiček na 10mm, počet řádů větvení, tvar špičky, tvar vrcholu špičky, barva špičky, barva vrcholu, barva báze špičky, viditelnost kortikálních buněk, druh povrchu pláště, celistvost pláště, barevné tečky na plášti a jejich barva, stříbřitost pláště po ponoření do vody, povrch pláště, přítomnost vycházejících hyf, umístění hyf, hustota hyf, přítomnost rhizomorf, tvar rhizomorf, povrch rhizomorf, četnost rhizomorf, barva rhizomorf, četnost rozvětvení rhizomorf, typ spojení rhizomorf s ektomykorhizou, místa vycházení rhizomorf. Některé znaky a jejich projevy byly v průběhu práce upraveny. Výsledkem morfologické klasifikace jsou typy ECM. Nejméně vzorků bylo odebráno na TVP Mumlavská hora, protože se na této ploše vyskytuje pouze několik živých jedinců smrku ztepilého.

Molekulárně-biologické metody

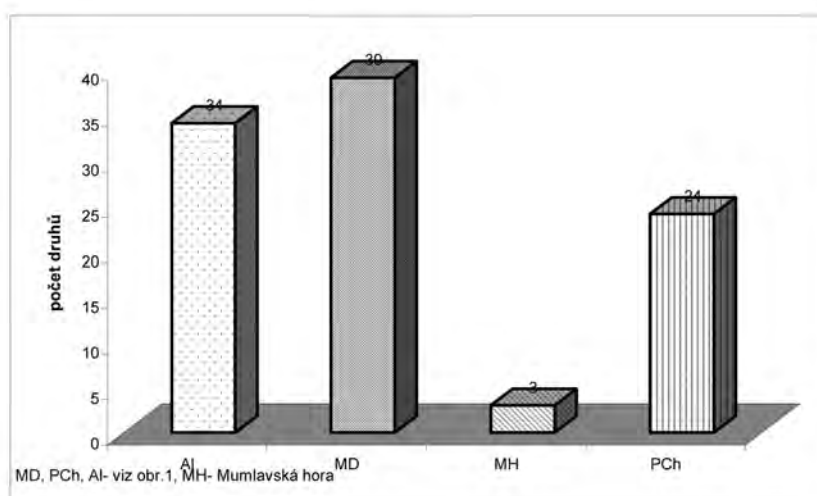
Pro tuto práci byl zvolen postup: izolace DNA, PCR a sekvenace. Pro identifikaci houby byl pomocí PCR amplifikován úsek ITS oblasti (Internal Transcribed Spacer). Pro tuto amplifikaci byly použity ITS 1F a ITS 4, jejichž pomocí došlo k namnožení výhradně houbové DNA. Jde o oblast kódující ribozomální RNA. Ve větší části případů jedna PCR reakce nestačila z důvodu nízké koncentrace DNA, proto byla PCR reakce zopakována. K vizualizaci produktů byla použita horizontální elektroforéza. Sekvenace byla prováděna dodavatelsky. Vzorky s nízkou koncentrací DNA

zpracovával tým Doc. Knolla z Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat AF MZLU v Brně, vzorky s vyšší koncentrací (vzorky z plodnic) byly odeslány na sekvenaci do Koreje. Sekvence jednotlivých vzorků byly porovnávány s databází GenBank – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a databází UNITE (<http://unite.ut.ee>), která se specializuje na kvalitně determinované ITS sekvence ECM hub. Na základě těchto databází byly jednotlivé vzorky určeny do rodů či druhů.

Výsledky a diskuze

Na všech plochách byly za období 1992-2007 nalezeny plodnice celkem 50 druhů ECM hub. Nejvíce druhů bylo nalezeno na TVP Modrý důl a nejméně na TVP Mumlavská hora (obr. 2).

PETER et al. (2008) našli v roce 2000 na stejných plochách 45 ECM druhů. V přirozené smrčíně na lokalitě Vyšné Hágy ve Vysokých Tatrách bylo v letech 2007 a 2008 identifikováno 40 fruktifikujících druhů ECM hub (CUDLÍN, nepublikovaná data). Ze stejně velké plochy horské smrčiny v Kysucích uvádějí CUDLÍN et. al (2008) 26 fruktifikujících druhů ECM hub. BRUNS (1995 ex GRYNDLER et. al 2004) uvádějí 13-35 druhů ECM hub na 0,1 ha lesa.



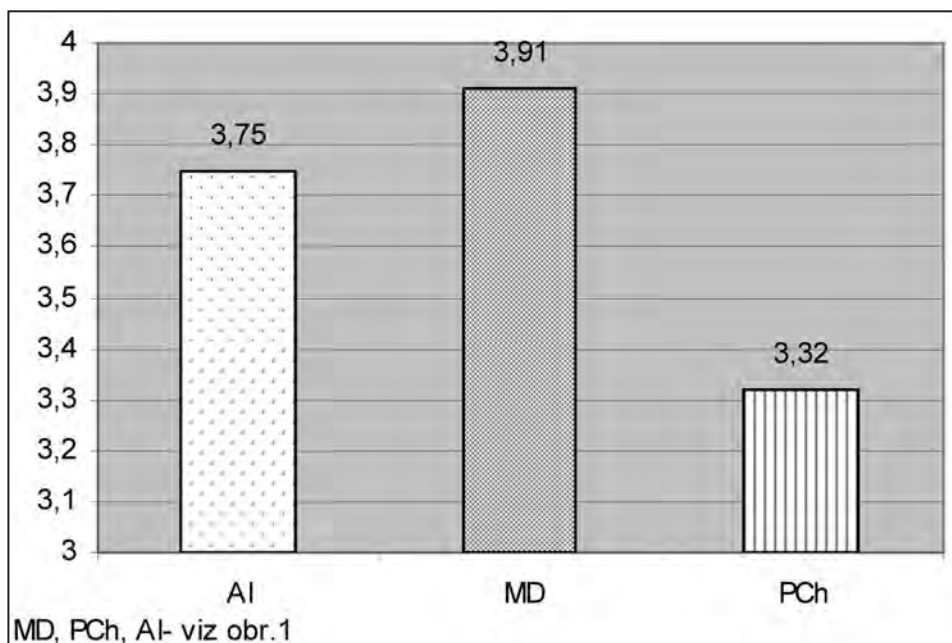
Obr. 2: Počet fruktifikujících druhů ECM hub v období 1992-2007

V odběrech provedených v letech 2007 a 2008 bylo na plochách rozlišeno 65 typů ECM. Nejzastoupenější typy a jejich procentuální zastoupení v jednotlivých obdobích jsou uvedeny v tab. 2. Za 15 let sběru plodnic byla pravděpodobně podchycena větší část spektra fruktifikujících ECM hub. Lze tedy předpokládat, že pokud by všechny druhy ECM houbových symbiontů tvořily plodnice, pak by 50 druhů ECM hub mohlo vytvořit 65 typů ECM nebo i více, protože ektomykorhizy některých druhů procházejí během svého vývoje morfologickou změnou houbového pláště. Tento ontogenetický vývoj ektomykorhiz popsal ve své práci CUDLÍN & CHMELÍKOVÁ (1999), kde vylíšili 3 třídy vitality (turgide, shriveled, dead) a 5 fází vývoje kořenové špičky (špička s aktivně rostoucím meristémem, špička s kořenovým vlášením, nemykorhizní špička, neúplně vytvořená ECM – pouze s Hartigovou sítí, plně vytvořená ECM – i s houbovým pláštěm).

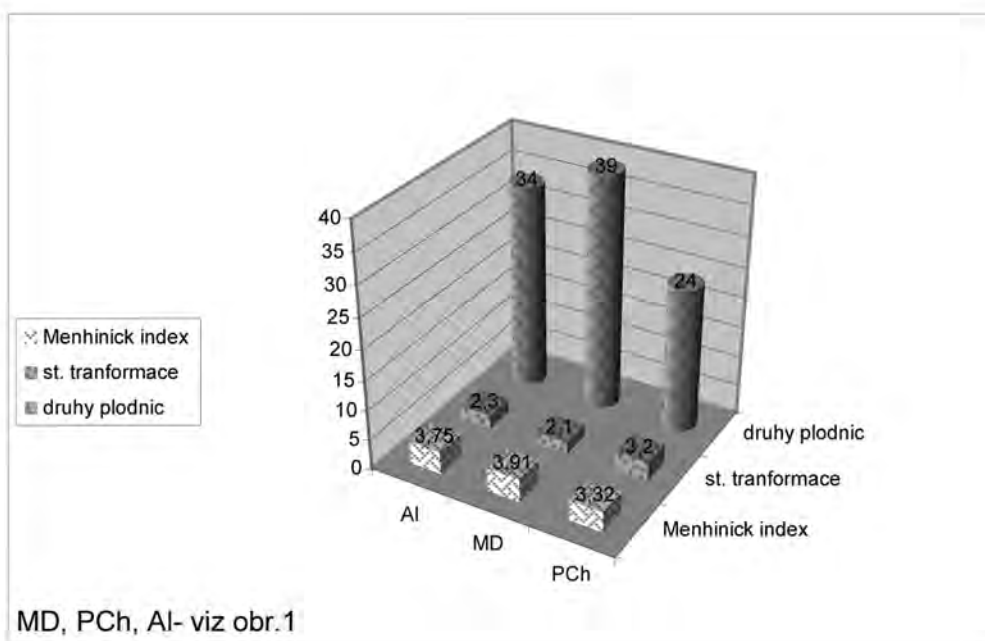
Tab. 2: Nejzastoupenější ECM typy na TVP a jejich procentuální podíl ze všech typů.

Plocha	2007	IX. 2008	X. 2008
	typ	typ	typ
AI	12 (20,7%)	45, 19 (každý 8,1%)	12, 25 (každý 17,2%)
MD	12 (18%)	12 (7,8%)	7 (14%)
MH	14 (18,8%)	12, 60, 36 a 39 (každý 25%)	x
PCh	1 (18,6%)	1 (16,1%)	12, 24, 33 (každý 5,7%)

MD, PCh, AI, MH- viz obr.1 a 2



Obr. 3: Menhinickův index biodiverzity.



Obr. 4: Vliv transformace struktury koruny na druhovou diverzitu fruktifikujících ECM hub a diverzitu morfologických typů ECM.

Biodiverzita ECM na jednotlivých plochách byla hodnocena pomocí Menhinickova indexu biodiverzity. Tento index počítá s počty typů a s jejich opakováním. Podle tohoto indexu je nejvyšší biodiverzita ECM na MD a nejnižší na PCh (obr. 3). Výsledky z TVP Mumlavská hora nebyly do výpočtu zahrnuty, jelikož počet odebraných vzorků byl velmi nízký.

Pomocí molekulárně-biologických metod byly v ECM identifikovány 4 rody a 11 druhů ECM hub (příloha 1, tab. 3). Některé druhy byly nalezeny opakovaně v různých typech ECM (např. *Tylospora fibrillosa* v typech 1, 12, 5 a 34) a naopak v některých typech bylo nalezeno více druhů (např. *Teleophora terrestris*, *Lactarius rufus*, *L. helvus*, *L. aurantiacus* a *Tylospora fibrillosa* v typu 12). PETER et al. (2008) uvádějí na stejných plochách druh *Tylospora fibrillosa* jako nejzastoupenější druh v ECM.

Závěr

Ze sběrů ECM plodnic je zřejmé, že na plochách je dostatek ECM druhů hub. Výjimku tvoří TVP Mumlavská hora, kde je lesní ekosystém nejpoškozenější a spektrum ECM hub je zde velmi nízké.

Biodiverzita ECM typů i druhů plodnic souvisí se stavem stromů na jednotlivých plochách, konkrétně se stupněm transformace struktury koruny (který vychází z defoliace a procentuálního zastoupení sekundárních výhonů). Na TVP Modrý důl byl zjištěn nejvyšší index biodiverzity, našlo se tam nejvíc fruktifikujících druhů ECM hub a stupeň transformace korun stromů byl nejnižší (obr 4). Na TVP Pašerácký chodníček byl nejnižší index biodiverzity, našlo se tam málo fruktifikujících druhů ECM hub a stupeň transformace korun stromů byl nejvyšší (obr. 4).

K některým typům ECM se podařilo na základě uvedených databází přiřadit druh ECM houby. Podařilo se také nalézt některé nefruktifikující druhy (např. *Tylospora fibrillosa*).

Tento výzkum bude pokračovat i v dalších letech. Jelikož zkoumání typů ECM je teprve na začátku, lze očekávat, že dojde ke změnám v počtu nalezených typů. Stejně tak i molekulárně-biologické analýzy jsou teprve na počátku, tudíž i zde lze očekávat nálezy nových druhů.

Poděkování

Publikace byla vytvořena za přispění projektu MŠMT NPV II 2B06068 a vědeckého záměru ÚSBE AV ČR AVOZ60870520. Dále děkujeme Doc. Knollovi a jeho týmu z Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat AF MZLU v Brně a Ing. Michalovi Černému z ÚSBE AV ČR za pomoc při odběru vzorků.

Literatura

- AGERER R. & RAMBOLD G. 2004–2008, [first posted on 2004-06-01; most recent update: 2007-05-02]. DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. www.deemy.de – München, Germany.
- BOHMANOVÁ M. 1992: Průzkum mykorrhizních poměrů smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) z imisních oblastí Krkonoš. [Diplomová práce]. Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Praha, 147 pp.
- BUREŠOVÁ, R., PLCH R., HOLUB F. 2008: Regenerační potenciál smrkových porostů pod vlivem stresové zátěže na lokalitě Sadibolovce. Závěrečná zpráva Reconstruction of non-native forest ecosystems endangered by the change of environment to ecologically more stable ecosystems. Depon in: ÚSBE AVČR, České Budějovice, 29 pp.
- CUDLÍN P. & CHMELÍKOVÁ E. 1999: Fine root regenerative potential of montane Norway spruce under pollution impact. *Phyton*, 39: 143-147.
- CUDLÍN P. & PETER M. 2008: Belowground ectomycorrhizal communities in tree Norway spruce stands with different degrees of decline in the Czech Republic. *Mycorrhiza*, 18: 157-169.
- CUDLÍN P., TEREZA M., JONÁŠOVÁ M., VÁVROVÁ E., CHMELÍKOVÁ E., GRONSKÝ R., BUREŠOVÁ R., PLCH R., HOLUB F. 2008: Regenerační potenciál smrkových porostů pod vlivem stresové zátěže na lokalitě Sadibolovce. Závěrečná zpráva Reconstruction of non-native forest ecosystems endangered by the change of environment to ecologically more stable ecosystems. Depon in: ÚSBE AVČR, České Budějovice, 29 pp.
- GRYNDLER M., BALÁŽ M., HRŠELOVÁ H., JANSÁ J., VOSÁTKA M. 2004: Mykorrhizní symbióza. Academia, Praha, vydání I, 366 pp.
- POLÁK T., CUDLÍN P., MORAVEC I. 2007: Macroscopic indicators for the retrospective assessment of Norway spruce crown response to stress in the Krkonoše Mountains. *Trees* 21, 23-35 pp.
- VÁVROVÁ E., CUDLÍN P., JONÁŠOVÁ M. 2007: Regeneration processes in mountain climax Norway Spruce in the Giant Mountains. pp 437-444. In: ŠTURSA J. & KNAPIK R. Geologické problémy Krkonoš. Sborn. Mez. Věd. Konf., říjen 2006, Svoboda nad Úpou. Opera Corcontica, 44/2.

Příloha 1 tab. 3: Popis ECM, u kterých byl identifikován druh houby

Druh a typ	Popis
Theleophora terrestris typ 12	vět. monopodiálně pyramidální, 8-14 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž., kort. b. slabě viditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. lesklý, h. ani rh. nejsou
Tomentella stiposa typ 11	vět. monopodiálně pyramidální, 14 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. hněděoranžová, b. vrcholu hněděoranžová, b. starších částí hněděoranžová, kort. b. neviditelné, druh p. pl. hustě zrnitý, hnědé tečky na pl., ECM je místy stříbřitá, p. pl. drsný nehebký, h. ani rh. nejsou
Tomentella sp. typ 24	vět. monopodiálně pyramidální, 11 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. černá, b. vrcholu černá, b. starších částí černá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. hustě zrnitý, tečky na pl. černé, p. pl. drsný nehebký, h. řídké, nerovnoměrně rozmístěné, rh. nejsou
Cortinarius sanguineus typ 16	vět. monopodiálně pyramidální, 3-11 š./1cm, 1 řád vět., š. klikatí se, vrchol š. nenadutý, b. š. žlutá, b. vrcholu žlutá, b. starších částí žlutá místy oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný až mírně vláknitý, zlatavý pl., p. pl. třpytivý, h. nejsou, rh. ploché, s vějířovitýma h., řídký výskyt, b. stejná jako pl., vět. občas v určitých místech, k KEM připojeny zešikma z více bodů, z ECM vychází ze střední části š.
Cortinarius croceus typ 16 (2 vzorky)	vět. monopodiálně pyramidální, 3-11 š./1cm, 1 řád vět., š. se klikatí, vrchol š. nenadutý, b. š. žlutá místy oranž., b. vrcholu žlutá, b. starších částí žlutá místy oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. hustě i mírně bavlněný až mírně vláknitý, zlatavý pl., p. pl. třpytivý, h. nejsou, rh. ploché, s vějířovitýma h., řídký výskyt, b. stejná jako pl., vět. občas v určitých místech, k ECM připojeny zešikma z více bodů, z ECM vychází ze střední části i z vrcholu š.
Cortinarius sp. (začínající) typ 1 i 20	vět. monopodiálně pyramidální, 10 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž. i bílá, b. vrcholu bledá i bílá, b. starších částí oranž., kort. b. slabě viditelné i neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný i mírně vláknitý, ECM je místy stříbřitá, p. pl. lesklý i třpytivý, h. nejsou, rh. ploché, s vějířovitýma h., hustý výskyt, b. stejná jako pl. ze kterého vychází, k ECM připojeny zešikma z více bodů, z ECM vychází nezřetelně
Cortinarius anomalus typ 19	vět. nepravidelně zpeřené skoro dichotomické, 8-10 š./1cm, 2 řády vět., š. klikatící se, vrchol š. nenadutý, b. š. bílá, b. vrcholu bílá, b. starších částí bílá místy oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. hustě vláknitý, p. pl. třpytivý, h. nejsou, rh. ploché, s vějířovitýma h., hustý výskyt, b. stejná jako pl., vět. časté, k ECM připojeny zešikma z více bodů, z ECM vychází po celé délce š.
Lactarius rufus typ 12	vět. monopodiálně pyramidální až korálové, 8-14 š./1cm, 2 řády vět., š. jednoduše ohnuté, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. hebký lesklý, h. ani rh. nejsou
Lactarius rufus typ 12 (2 vzorky)	vět. monopodiálně pyramidální, 8-14 š./1cm, 1 i 2 řády vět., š. klikatící se, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž. až lilkovitá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. hebký, lesklý, h. ani rh. nejsou
Lactarius rufus typ 12	vět. monopodiálně pyramidální, 8-14 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž. až narůžovělá, b. vrcholu bledá i nažloutlá, b. starších částí oranž. až narůžovělá, kort. b. slabě viditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. lesklý, hebký, h. ani rh. nejsou
Lactarius helvus typ 12	vět. korálové i monopodiálně pyramidální, 8-14 š./1cm, 2 řády vět., š. rovné i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu nažloutlá, b. starších částí oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. hebký, lesklý, h. ani rh. nejsou
Lactarius aurantiacus typ 12	vět. monopodiálně pyramidální, 8-14 š./1cm, 2 řády vět., š. klikatící se, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu nažloutlá, b. starších částí oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. matný, h. ani rh. nejsou
Russula emetica typ 36	š. rovné, vrchol š. nadutý na konci zduřelý, b. š. oranž. až narůžovělá, b. vrcholu narůžovělá, b. starších částí oranžová až narůžovělá, kort. b. slabě viditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. lesklý, hebký, h. ani rh. nejsou
Russula emetica typ 35	vět. monopodiálně pyramidální, 2 řády vět., š. jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. narůžovělá až lilkovitá, b. vrcholu oranž. až nečervená, b. starších částí narůžovělá až našedlá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. matný, h. ani rh. nejsou
Russula sp. typ 36	vět. monopodiálně pyramidální, 8-10 š./1cm, 1 řád vět., š. klikatící se, vrchol š. nenadutý, b. š. narůžovělá až oranž., b. vrcholu nažloutlá, b. starších částí narůžovělá až oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. hebký, lesklý, h. nerovnoměrně, řídké, rh. nejsou

Příloha 1 tab. 3: Popis ECM, u kterých byl identifikován druh houby - pokračování

Druh a typ	Popis
Russula sp. (asi ochroleuca) typ 32	vět. monopodiálně pyramidální, 2 řády vět., š. klikatící se i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. narůžovělá, b. vrcholu bledá i narůžovělá, b. starších částí narůžovělá až lilkovitá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bradavičnatý, nažloutlé tečky na pl., p. pl. hebký, h. ani rh. nejsou
Russula ochroleuca (ne dle pcr) typ 18	vět. monopodiálně pyramidální, 1 řád vět., š. rovné i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý i kyjovitý, b. š. nažloutlá až narůžovělá, b. vrcholu nažloutlá, b. starších částí narůžovělá až oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bradavičnatý, nažloutlé tečky na pl., p. pl. hebký, lesklý, h. ani rh. nejsou
Inocybe sp. typ 14	vět. monopodiálně pyramidální, 6 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. nažloutlá, b. vrcholu bledá, b. starších částí nažloutlá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně vlněný, p. pl. hebký, lesklý, h. řídké, nerovnoměrně rozmístěné, rh. nejsou
Wilcoxina sp. typ 4	vět. monopodiálně pyramidální, 5-6 š./1cm, 1 řád vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. oranžovočervená, b. vrcholu bledá, b. starších částí načervenalá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. lesklý, h. ani rh. nejsou
Laccaria proxima typ 1	vět. monopodiálně pyramidální, 10 š./1cm, 2 řády vět., š. rovné i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž. až nahnědlá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. síťkovitý, ECM je místy stříbřitá, p. pl. hebký místy stříbřítý, h. ani rh. nejsou
Tylospora fibrillosa typ 1	vět. monopodiálně pyramidální, 10 š./1cm, 2 řády vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně vlněný, ECM je místy stříbřitá, p. pl. hebký místy třpytivý, h. rovnoměrně po špičce, řídké, rh. nejsou
Tylospora fibrillosa typ 12	vět. nepravidelně zpeřené, 8-14 š./1cm, 2 řády vět., š. klikatící se i jednoduše ohnuté, vrchol š. nenadutý, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž., kort. b. neviditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. hebký, lesklý, h. ani rh. nejsou
Tylospora fibrillosa typ 5	vět. monopodiálně pyramidální, 1 řád vět., š. rovné, vrchol š. kyjovitý, b. š. oranž., b. vrcholu bledá, b. starších částí oranž. až načervenalá, kort. b. dobře viditelné, druh p. pl. mírně bavlněný, p. pl. hebký, lesklý, h. ani rh. nejsou
Tylospora fibrillosa typ 34	vět. monopodiálně pyramidální, 2 řády vět., š. rovné, vrchol š. nenadutý, b. š. narůžovělá až naředlá, b. vrcholu oranž., b. starších částí naředlá, kort. b. neviditelné, druh p. pl. hustě vlněný, místy svaštělý, p. pl. drsný, nehebký, h. rovnoměrně po špičce, husté, rh. nejsou
	Použité zkratky: ECM: ektomykorhiza, vět.: větvení ECM, š.: špičky, b.: barva, oranž.: oranžová, kort. b.: kortikální buňky, p. pl.: povrch pláště, pl.: plášť, h.: hyfy, rh.: rhizomorfy.

Kontakt

Filip Holub^{1,2}, Miloň Dvořák¹, Pavel Cudlín², Ewa Chmelíková²

¹Ústav ochrany lesů a myslivosti, LDF MZLU v Brně, Zemědělská 3, 613 00, Brno

²Ústav systémové biologie a ekologie, AV ČR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05, České Budějovice

filip@usbe.cas.cz; milon.dvorak@mendelu.cz; pavelcu@usbe.cas.cz; ewa.ch@mybox.cz

AKTUÁLNÍ MYKORHIZNÍ SITUACE KRKONOŠSKÝCH SMRČIN

Vítězslava Pešková, František Soukup

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.

Úvod

I když extrémně silné emise síry byly již na konci 20. století značně zredukovány, je stále imisní situace ve střední Evropě ovlivňována významnými acidifikačními procesy včetně depozice dusíku. Těmto minulým i současným změnám půdního chemismu se přisuzuje zásadní vliv na ústup ektomykorhizních hub a s tím související rozvoj a distribuci jemných kořenů a mykorhiz, které tak ve výsledku ovlivňují zdravotní stav lesních porostů.

Pro hodnocení míry narušení ektotrofní stability porostů je možné využít jak údaje o druhovém zastoupení mykorhizních hub, tak i data o zastoupení různých forem mykorhiz v kořenových sondách (FELLNER & PEŠKOVÁ 1995), nebo i nepřímo údaje o stavu korun stromů (CUDLÍN et al. 1999) a samozřejmě také z různých kombinací těchto metod.

Dosavadní výsledky výzkumu mykorhiz ukazují na diagnostický význam stanovení procentuálního podílu mykorhizních druhů makromycetů vztažených k celkovému množství druhů nebo jen k nemykorhizním druhům. Tento poměr do jisté míry reflektuje mykorhizní poměry a jejich nízké zastoupení indikuje narušení ektotrofní stability lesa. Poškození lesa způsobené především v důsledku vzdušného znečištění lze popsat třemi stádii narušení ektotrofní stability lesa (latentní, akutní, letální), jež jsou přímo spojena s určitými fázemi ochuzování houbových společenstev, ale i s případným nárůstem fruktifikace některých specifických druhů (FELLNER 1989).

Pozitivní závislost vztahu mezi „indexem asimilační kapacity produkční části koruny“ jednotlivých stromů a počty plodnic všech ektomykorhizních druhů hub, nalezených pod průmětem jejich koruny, zjistil statistickými testy v horských smrkových ekosystémech MALENOVSKÝ et al. (2000). Z výsledků studie vyplývá přímý vztah mezi postupným poškozováním asimilačního aparátu a počtem plodnic ektomykorhizních hub.

Studium jemných kořenů je dalším důležitým zdrojem informací pro pochopení vztahů v lesních ekosystémech. Dynamika rozvoje jemných kořenových systémů a ektomykorhiz je řízena jednak vnitřními faktory dřeviny, podmínkami půdního prostředí (dostupností vody, aciditou, dostupností minerálních látek, obsahem organické hmoty v půdě atd.) a povětrnostními vlivy. Mykorhizní kořenový systém lesních dřevin poměrně citlivě reaguje na acidifikaci půdy, vápnění a hnojení. Předložená práce staví na těchto předpokladech a předkládá srovnání mykorhizních poměrů na rozdílných stanovištích.

Materiál a metody

K srovnávací studii byly vybrány dvě plochy ležící v oblasti Obřího dolu – Růžová hora (RH) a Sněžka (SN) a pro srovnání dvě plochy v oblasti Tetřevích bud – Tetřeví vrch (TV), Jelení vrch (JV). Plochy leží na území KRNP, LS Horní Maršov a LS Vrchlabí. Plocha označená jako Růžová hora se nachází na moréně na levém břehu řeky Úpy (50°43'N, 15°44'E, 980 m n. m., vegetační typ – *Vaccinio-Piceetum*, stáří porostu 100 let, téměř 100% *Picea abies*). Plocha označená jako Sněžka se nachází na lokalitě Pod kovárnou (50°44'N, 15°44'E, 1 000 m n. m., vegetační typ – *Calamagrostio villosae-Piceetum*, stáří porostu 90 let, 100% *Picea abies*). Plocha označená jako Tetřeví vrch byla vytyčena na lokalitě Rejdiště (50°40'N, 15°41'E, 1 010 m n. m., vegetační typ

– *Calamagrostio villosae-Piceetum*, stáří porostu 80 let, 100% *Picea abies*). Plocha označená jako Jelení vrch se nalézá poblíž loveckého zámečku (50°40'N, 15°42'E, 1 040 m n. m., vegetační typ – *Calamagrostio villosae-Piceetum*, stáří porostu 80 let, 100% *Picea abies*).

V letech 2004 – 2007 jsme na všech čtyřech plochách souběžně sledovali fruktifikaci makromycetů, defoliaci a především odebírali standardní metodou půdní sondou kořenové vzorky.

Na každé ploše bylo vybráno a očíslováno 100 stromů. Během výzkumu se na nich prováděl ve vegetačním období cca 1x měsíčně sběr makromycetů (podrobnosti viz PEŠKOVÁ & SOUKUP 2006a) a v jarním a podzimním období byly odebírány kořenovou sondou vzorky kořenů (PEŠKOVÁ 2000). Analýza jarních a podzimních odběrů poskytla data o míře mykorhizace. Jsou to průměrné hodnoty hustoty (**Hu**) a procentuálního podílu (%) mykorhiz z pěti odebraných sond. Hustota aktivních (**Am**) a neaktivních (**Nm**) mykorhiz byla počítána jako průměrná hodnota počtu mykorhiz vztažená na 1 cm délky kořene. Procentuální podíl mykorhiz byl kalkulován jako poměr aktivních a neaktivních mykorhiz z celkového počtu všech nalezených mykorhiz. Základním postupem při analýze byla extrakce a identifikace všech aktivních a neaktivních mykorhizních špiček na standardním vzorku tj. segmentu kořenu 5 cm dlouhém o průměru do 1 mm. Takto bylo vyhodnoceno 20 základních kořenových segmentů v každé sondě. Počty jednotlivých typů mykorhizních špiček byly určovány pod binokulární lupou podle jejich tvaru a struktury (PEŠKOVÁ & SOUKUP 2006b).

Na plochách byl dále hodnocen zdravotní stav smrků pomocí standardní klasifikace defoliace korun. Defoliace je definována jako relativní ztráta asimilačního aparátu v koruně stromu v porovnání se zdravým stromem, rostoucím ve stejných porostních a stanovištních podmínkách (RÖSEL & REUTHER 1995, FABIÁNEK et al. 2004). Defoliace se vyjadřuje procenticky v intervalech po 5%. Hodnotila se vizuálně a byla proto zatížena určitou chybou, vyplývající ze subjektivního vlivu hodnotitele. Chyba byla minimalizována tím, že každý strom posuzovali 3 hodnotitelé a použita byla průměrná hodnota. Hodnocení zdravotního stavu smrků bylo na trvalých pokusných plochách prováděno na přelomu srpna a září. Celkem bylo na čtyřech plochách hodnoceno 400 jedinců – 100 vybraných a označených stromů na každé ploše.

Při vyhodnocování druhové diverzity mykorhizních a dalších makromycetů byly vybrané porosty pravidelně sledovány, a to přibližně jedenkrát měsíčně v průběhu fruktifikačního období. Údaje získané při standardním mykologickém monitoringu (2500 m² pro každou plochu) zahrnují jména zjištěných druhů makromycetů (nomenklatura převážně podle KREISELA 1987, upravena v některých případech podle LEGONA & HENRICIHO 2005), údaje o abundanci druhu (počet plodnic jednotlivých druhů na ploše) a frekvenci (výskyt druhu na dílčích plochách o velikosti 100 m²) v jednotlivých měsících fruktifikace.

Výsledky

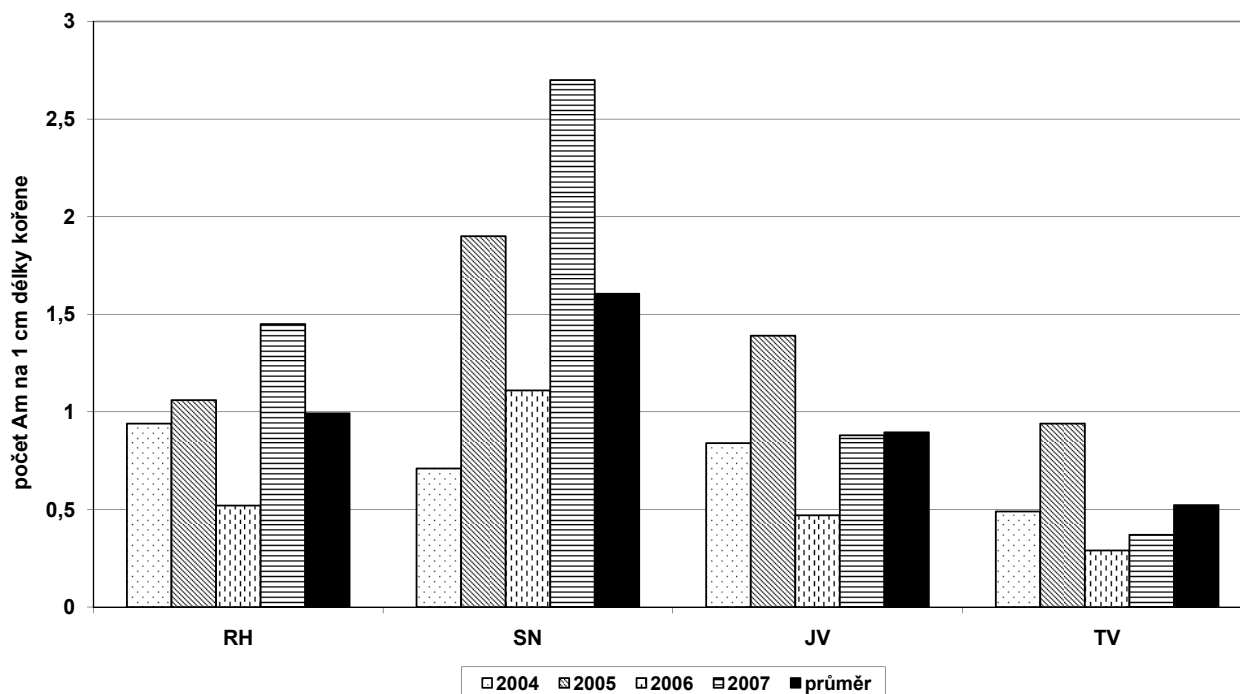
Mykorhizy

Z dat uvedených v tabulce 1 je patrné, že nejvyšší hodnoty hustoty Am (obr. 1) vykazovala plocha Sněžka (2,7 cm⁻¹) na podzim v r. 2007, rovněž průměrná hodnota hustoty Am (jaro, podzim) byla na této ploše za čtyři sledované roky nejvyšší (1,19 cm⁻¹). Nejnižší hodnoty vykazoval Tetřeví vrch (0,29 cm⁻¹) na podzim r. 2006, kde byly rovněž hustoty Am (jaro, podzim) za sledované období nejnižší (0,60 cm⁻¹). Porovnáním krytých a exponovaných stanovišť byla nejvyšší hustota na podzim na krytých plochách (1,48 cm⁻¹) a nejnižší na jaře na exponovaných stanovištích (0,87 cm⁻¹). Taktéž roční hustota Am (jaro, podzim) byla na krytých stanovištích výrazně vyšší (1,19 cm⁻¹).

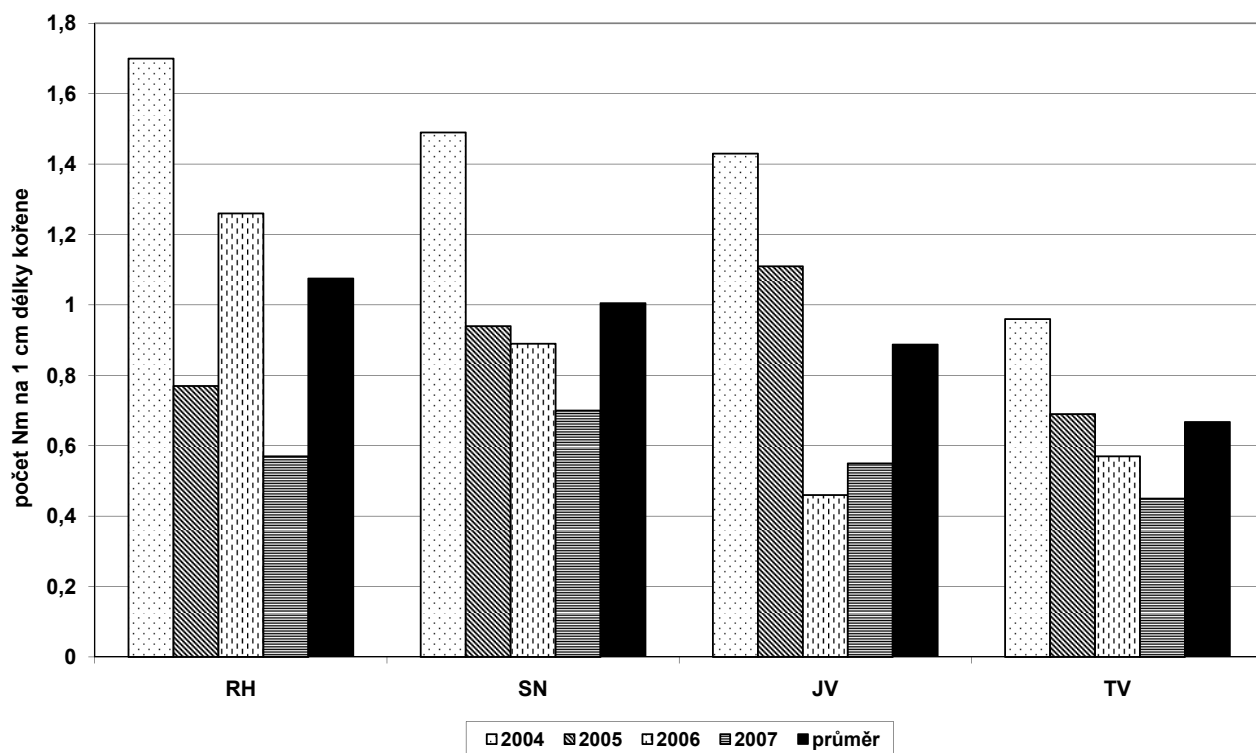
Hustota Nm byla nejnižší na ploše Jelení vrch (0,43 cm⁻¹) na jaře v r. 2007. Nejvyšší byla na podzim v r. 2004 (obr. 2) na ploše Růžová hora (1,7 cm⁻¹). Nejnižší roční hustota Nm (jaro, podzim) byla zaznamenána na Tetřevím vrchu (0,69 cm⁻¹) a nejvyšší na ploše Růžová hora (1,08 cm⁻¹). Při srovnání krytých a exponovaných ploch byla hustota Nm nižší na exponovaných stanovištích (0,73 cm⁻¹) na jaře a nejvyšší na podzim na krytých plochách (1,32 cm⁻¹). Roční hustota Nm (jaro, podzim) byla nižší na exponovaných plochách (0,75 cm⁻¹).

Tab.1: Hodnoty hustoty a procentuálního podílu mykorhiz v letech 2004 - 2007

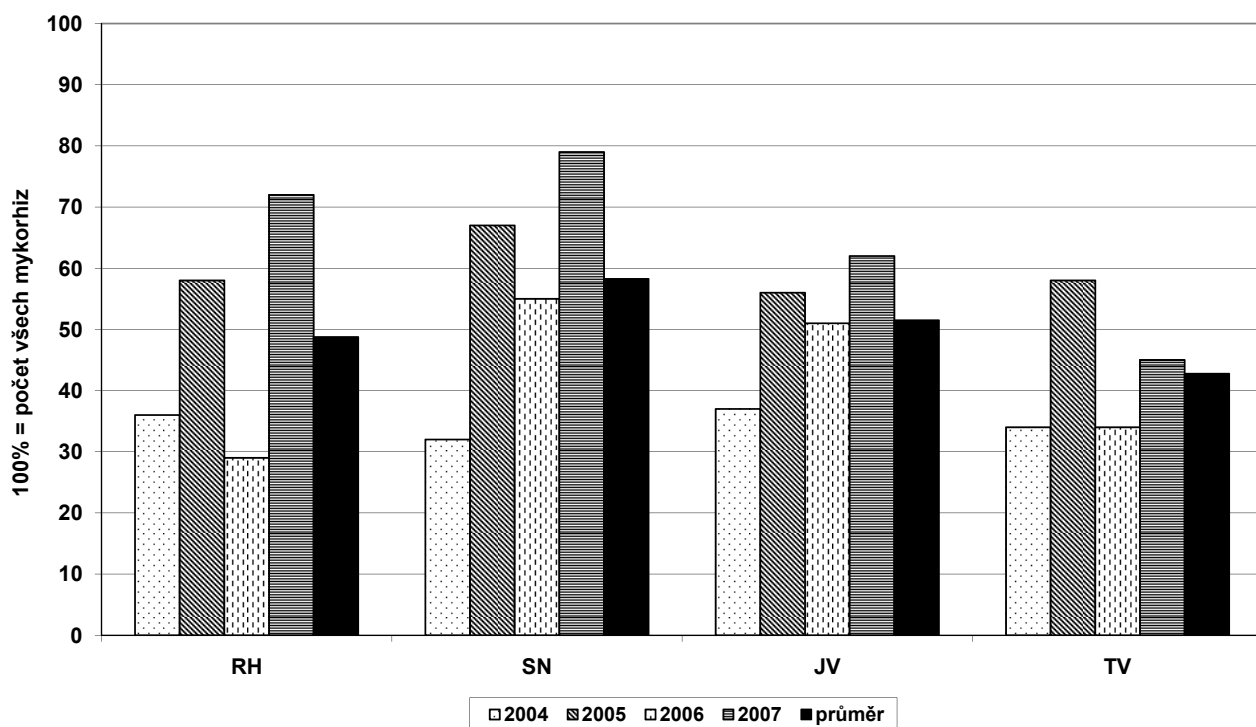
Růžová hora	HuAm Jaro	HuAm-Podz.	HuNm-Jaro	HuNm-Podz.	HuCelk. Jaro	HuCelk. Podz.	%Am Jaro	%Am-Podz.	%Nm Jaro	%Nm-Podz.
2004	0,97	0,94	0,77	1,7	1,74	2,63	56	36	44	64
2005	1,71	1,06	0,74	0,77	2,46	1,82	70	58	30	42
2006	0,59	0,52	1,38	1,26	1,97	1,79	30	29	70	71
2007	0,75	1,45	1,47	0,57	2,22	2,02	34	72	66	28
průměr	1,01	0,99	1,09	1,08	2,10	2,07	47	49	53	51
Sněžka	HuAm Jaro	HuAm-Podz.	HuNm-Jaro	HuNm-Podz.	HuCelk. Jaro	HuCelk. Podz.	%Am Jaro	%Am-Podz.	%Nm Jaro	%Nm-Podz.
2004	1,17	0,71	0,73	1,49	1,9	2,2	62	32	38	68
2005	0,87	1,9	0,92	0,94	1,79	2,84	49	67	51	33
2006	1,22	1,11	0,68	0,89	1,9	1,99	64	55	36	45
2007	1,44	2,7	0,63	0,7	2,07	3,39	70	79	30	21
průměr	1,18	1,61	0,74	1,01	1,92	2,61	61	58	39	42
Jelení vrch	HuAm Jaro	HuAm-Podz.	HuNm-Jaro	HuNm-Podz.	HuCelk. Jaro	HuCelk. Podz.	%Am Jaro	%Am-Podz.	%Nm Jaro	%Nm-Podz.
2004	1,03	0,84	1,09	1,43	2,13	2,27	49	37	51	63
2005	1,71	1,39	0,75	1,11	2,46	2,49	70	56	30	44
2006	0,98	0,47	0,73	0,46	1,71	0,93	57	51	43	49
2007	0,49	0,88	0,43	0,55	0,92	1,42	53	62	47	38
průměr	1,05	0,90	0,75	0,89	1,81	1,78	57	52	43	48
Tetřeví vrch	HuAm Jaro	HuAm-Podz.	HuNm-Jaro	HuNm-Podz.	HuCelk. Jaro	HuCelk. Podz.	%Am Jaro	%Am-Podz.	%Nm Jaro	%Nm-Podz.
2004	0,76	0,49	0,67	0,96	1,44	1,45	53	34	47	66
2005	0,79	0,94	0,56	0,69	1,34	1,63	59	58	41	42
2006	0,35	0,29	0,52	0,57	0,87	0,86	41	34	59	66
2007	0,82	0,37	1,1	0,45	1,92	0,83	43	45	57	55
průměr	0,68	0,52	0,71	0,67	1,39	1,19	49	43	51	57



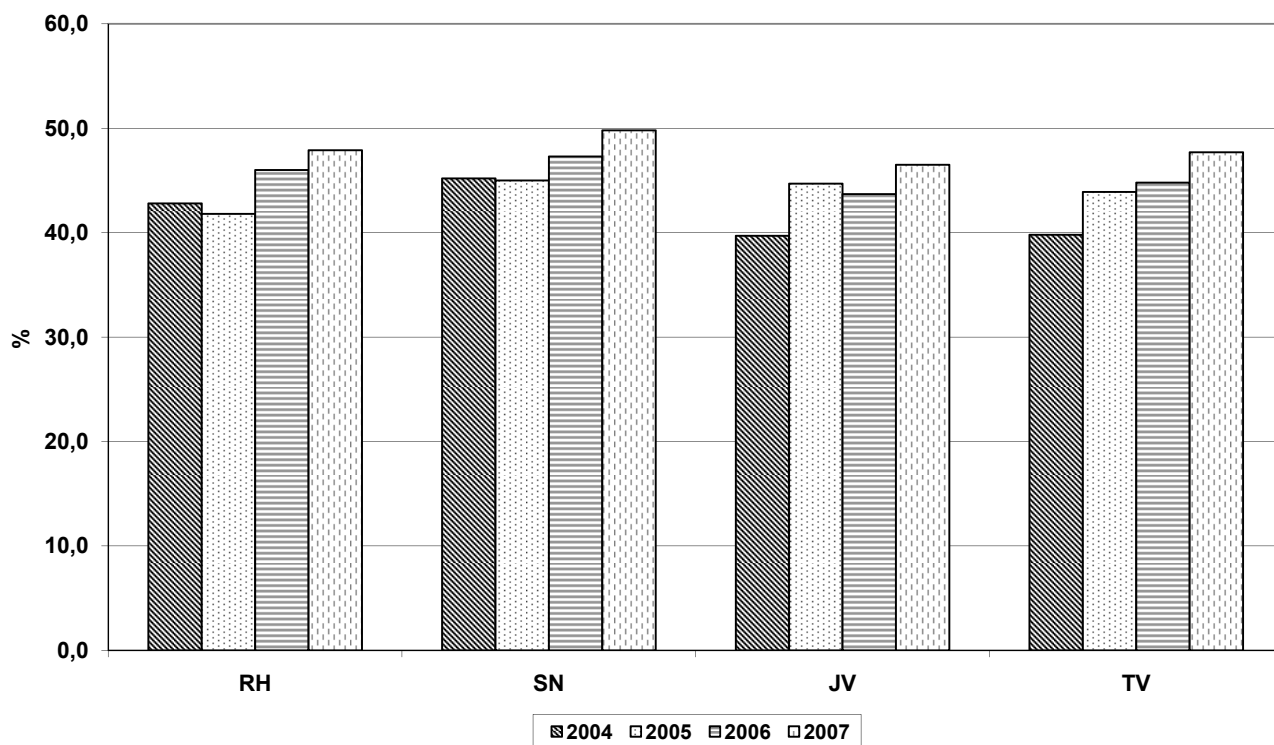
Obr. 1: Hustota aktivních mykorhiz (Am) z podzimních odběrů



Obr. 2: Hustota neaktivních mykorhiz (Nm) z podzimních odběrů



Obr. 3: Procentuální podíl aktivních mykorhiz (Am) z podzimních odběrů



Obr. 4: Srovnání defoliace v letech 2004 - 2007

Procentuální podíl Am (obr. 3) byl nejvyšší na ploše Sněžka (79 %) na podzim v r. 2007, taktéž průměrné % Am (jaro, podzim) za čtyři sledované roky bylo na ploše Sněžka nejvyšší (60%). Naopak nejnižší podíl Am byl registrován na Růžové hoře (29 %) na podzim v r. 2006. Nejnižší roční podíl AM (jaro, podzim) byl zjištěn na Tetřevím vrchu (46 %). Při porovnání procentuálního podílu na obou rozdílných stanovištích jsou vyšší hodnoty na krytých stanovištích na jaře (54 %) a nižší na podzim na exponovaných stanovištích (49 %). Rovněž roční procentuální podíl je lepší na krytých plochách (53 %).

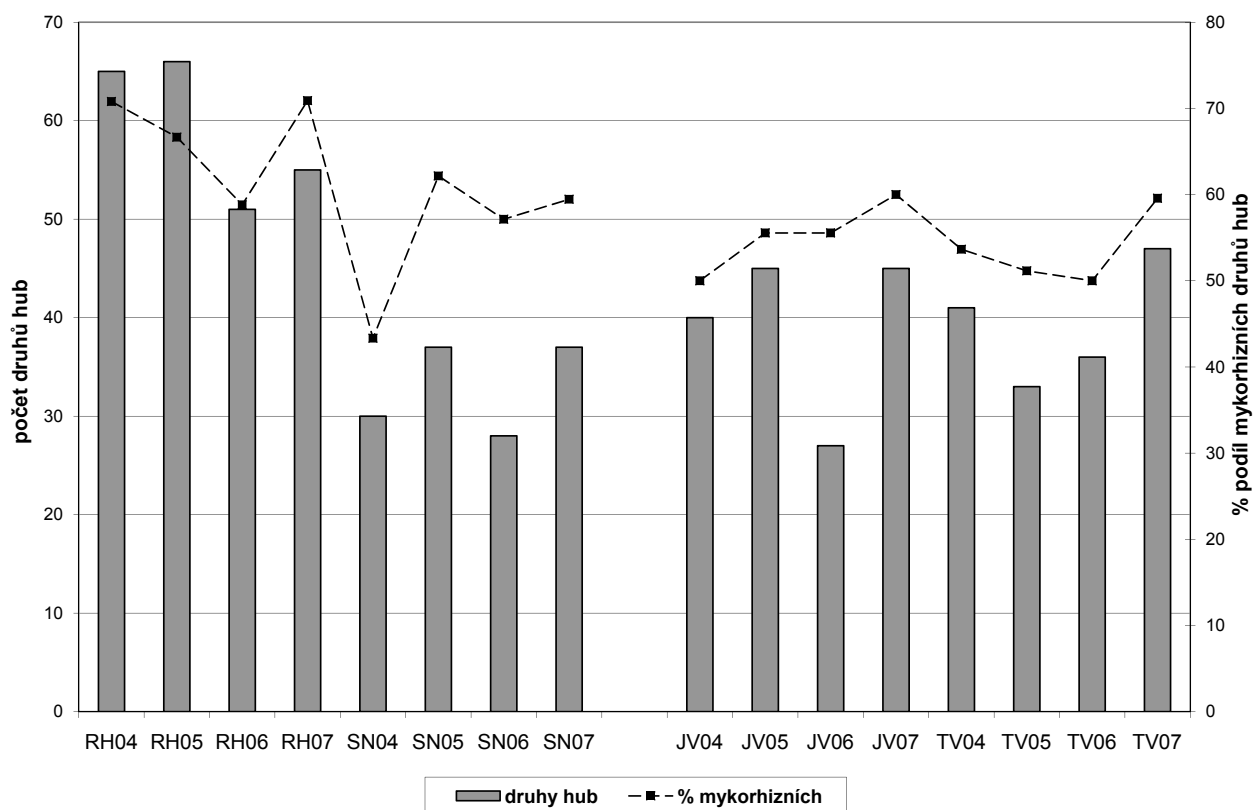
Porovnáme-li mykorhizní situaci na krytých a exponovaných stanovištích, jsou celkově patrně vyšší hodnoty aktivních mykorhiz na krytých stanovištích. Hodnoty neaktivních mykorhiz jsou na krytých plochách rovněž vyšší, rozdíl není však tak výrazný.

Defoliace

V letech 2004 - 2007 byla průměrná primární defoliace na ploše Růžová hora 45 % a na Sněžce 47 %, na ploše Jelení vrch 44 % a na Tetřevím vrchu 44 %. Porovnáním krytých a exponovaných ploch nebyl registrován rozdíl v defoliacích. Je možné říci, že na všech čtyřech plochách docházelo v průběhu sledování k mírnému nárůstu defoliace (obr. 4). Rozdíl mezi plochami v Obřím dole a na exponovaných stanovištích u Tetřevích bud je minimální, o 2 % je vyšší defoliace na krytých lokalitách.

Makromycety

Výrazné pozitivní změny byly zaznamenány v nárůstu počtu druhů makromycetů i v procentuálním podílu mykorhizních druhů hub (obr. 5). Na ploše Sněžka se průměrný počet druhů zvýšil z původních 30 druhů v r. 2004 na 37 v r. 2007. Na ploše Jelení vrch bylo v r. 2004 zjištěno 40 druhů hub a v r. 2007 již 45. Na Tetřevím vrchu vzrostl jejich počet z 41 na 47 druhů. Pouze na ploše Růžová hora došlo k poklesu z 65 druhů v r. 2004 na 55 druhů v r. 2007. Porovnáním počtu druhů na exponovaných a krytých stanovištích byl vyšší počet druhů na krytých lokalitách.



Obr. 5: Druhová diverzita makromycetů

Průměrný procentuální podíl mykorrhizních hub vzrostl na všech sledovaných plochách. Na ploše Sněžka průměrný procentuální podíl mykorrhizních hub vzrostl z původních 43 % v r. 2004 na 59 % v r. 2007. Na Jelením vrchu byl nárůst z 50 % na 60 % v r. 2007. Na ploše Tetřeví vrch stoupl podíl mykorrhizních druhů z 54 % v r. 2004, na 60 % v r. 2007. Na ploše Růžová hora zůstal podíl mykorrhizních hub po čtyřech letech stejný, avšak ze všech čtyřech srovnávaných ploch nejvyšší 71 %. Porovnáním krytých a exponovaných ploch je procentuální podíl mykorrhizních druhů hub vyšší na krytých lokalitách, a to o 7 %.

Porovnáním počtu rodů mykorrhizních hub byl zjištěn nejvyšší počet na plochách Tetřeví vrch v r. 2004 (12) a Jelení vrch v r. 2005 (12). Nejnižší počet byl na ploše Sněžka v r. 2005 (7) a ploše Růžová hora v r. 2006 (7). Porovnáním krytých a exponovaných stanovišť byl průměrný počet rodů mykorrhizních hub v letech 2004 - 2007 na exponovaných stanovištích vyšší (22), na krytých lokalitách nižší (17). Počty nalezených rodů všech makromycetů byly nejvyšší v r. 2005 na Růžové hoře (17), naopak nejméně rodů bylo zaznamenáno v r. 2006 na ploše Sněžka, Jelení vrch (10). Porovnáním krytých a exponovaných stanovišť jsou průměrné počty rodů všech nalezených makromycetů stejné (26).

Detailnější statistické vyhodnocení dat naráží na několik problémů. Roky se vlivem různých meteorologických podmínek výrazně liší. Data získaná v krátké časové řadě neumožňují využití běžných testovacích postupů. Jako nejvhodnější se proto v této situaci jeví neparametrické srovnání párovaných hodnot z exponovaných a krytých stanovišť (n=8). Tyto testy ukázaly statisticky významné rozdíly (na hladině významnosti 5%) v zastoupení hustoty aktivních i hustoty neaktivních mykorrhiz na podzim a to i tam, kde nepříliš zřetelné rozdíly v průměrných hodnotách pouze naznačovaly tyto možnosti. K zpracování dat byl použit program Statistica 6.0 (Statsoft Inc.).

Diskuse

Naše data odpovídají teoretickým předpokladům o ovlivnění celé řady základních parametrů lesa exponovaných horských smrčín na celou řadu základních parametrů lesa (VACEK et al. 2007). Potvrzují také zlepšující se situaci smrkových porostů. Jednotlivé aspekty zahrnuté do výzkumu

mají svoji specifickou problematiku. Jejich vzájemné porovnání pak naznačují významné souvislosti důležité pro rozvoj smrkových porostů.

Spektrum makromycetů

Řada autorů poukazuje na souvislost mezi narušením mykorhizních poměrů či ústupem mykorhizních hub na jedné straně a vlivy vzdušného znečištění (SCHLECHTE 1986, FELLNER 1989, 1993, TER-MORSHUIZEN & SCHAFFERS 1987, ARNOLDS 1989, GULDEN et al. 1992), případně na vztah s vizuálně hodnotitelným poškozením lesních dřevin (JAKUCS 1986, JANSEN 1991, FELLNER & SOUKUP 1991) na straně druhé. Ochuzování původně bohatého spektra ektomykorhizních hub postupuje s celkovým oslabováním porostů v horských a podhorských oblastech (LEPŠOVÁ et al. 1987).

Námi získané výsledky jsou v souladu s poznatky získanými na dalších lokalitách v Krkonoších (FELLNER & LANDA 2003). Rozšíření makromycetů v krkonošských lesích signalizuje výrazný nárůst v druhové diverzitě, abundanci a frekvenci. Týká se to především druhů mykorhizních, významně ovlivňujících výživu lesních dřevin a klimaxových horských smrčín, v minulých desetiletích nejvýrazněji mykorhizně ochuzených i zdravotně postižených. Vysoká citlivost vůči imisím u řady druhů ektomykorhizních hub byla evidentně důvodem jejich ústupu v 80. letech, kdy se druhová diverzita mykorhizních hub v klimaxových horských smrčínách Krkonoš snížila na méně jak jednu pětinu druhů běžně uváděných z těchto lesů ještě kolem roku 1960 na polské straně Krkonoš (NESPIAK 1971). Současný enormní nárůst hub je ve zřejmé negativní korelaci s hladinami emisí (zejména SO₂) v ČR v průběhu 90. let a zdá se, že převyšuje i údaje o zastoupení hub v Krkonoších na počátku 60. let. Naznačuje to reálnost prognózy výrazného revitalizačního trendu v krkonošských smrčínách (FELLNER & LANDA 2000).

Mykorhizní situace

Hustota mykorhiz je ovlivněna především dlouhodobě existujícími lokálními podmínkami, zatímco procentuální podíl mykorhiz patrně citlivěji reaguje na okamžité změny, jako je např. vláhový stres, změny imisní situace atd. Jiným komplikujícím faktorem může být opakující se silná defoliace způsobená hmyzím žírem, jež může zásadním způsobem redukovat mykorhizní aktivitu v příslušných letech, jak to bylo názorně prokázáno Lastem a jeho spolupracovníky (LAST et al. 1979) při uměle provedeném odlistění mladých bříz.

Vztah mykorhizace a defoliace

Výsledky mykorhizních a mykologických výzkumů v dubových, smrkových a bukových porostech (FELLNER et al. 1991, 1993, 1995, SOUKUP et al. 2001, 2002, 2003) ukazují většinou pozitivní korelaci procentuálního podílu mykorhizních druhů hub (posuzováno podle fruktifikace) k zjištěnému procentuálnímu podílu aktivních mykorhiz získaných z půdních sond. Na většině sledovaných dubových ploch vykazoval procentuální podíl aktivních mykorhiz negativní korelaci s výraznou defoliací stromů. Tento závěr mívá své omezení a platí pouze pro stromy s vysokou mírou defoliace (vyšší než 60%) a zpravidla na stanovištích vykazující obdobnou hustotu mykorhiz (FELLNER & PEŠKOVÁ 1995).

Závěr

Srovnání mykorhizních charakteristik a dalších parametrů lesa (makromycety, defoliace) na tzv. krytých a exponovaných stanovištích naznačuje, že smrkové porosty situované na víceméně krytých dnech údolí vykazují mírně lepší hodnoty v hustotě aktivních mykorhiz, procentuálním podílu aktivních mykorhiz a v procentuálním podílu mykorhizních druhů hub. Defoliace, hustota neaktivních mykorhiz a počet rodů mykorhizních hub byly překvapivě mírně lepší na exponovaných stanovištích. Početnost rodů všech nalezených makromycetů byla stejná. Je možné konstatovat, že byly zjištěny rozdíly v některých sledovaných parametrech na krytých a exponovaných plochách Krkonoš, které odpovídají předpokládanému vlivu specifických klimatických faktorů.

Poznámka

Mykorhizní charakteristiky na krytých a exponovaných stanovištích byly sledovány a hodnoceny v rámci řešení výzkumného záměru MZe 0002070203 „Stabilizace funkcí lesa v antropogenně narušených a měnících se podmínkách prostředí“.

Literatura

- ARNOLDS E. 1989: The changing macromycete flora in the Netherlands. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 90: 391–406.
- CUDLÍN P., CHMELÍKOVÁ E., MALENOVSKÝ Z., ZEMEK F., HEŘMAN M. 1999: Zjišťování vztahů mezi fruktifikací ECM hub a stanovištními faktory na trvalých výzkumných plochách pomocí „MINI GIS“. pp. 27-30. In: Jankovský L., Krejčíř R., Antonín V. (eds.): *Houby a les. Sborník referátů*, MZLU, Brno.
- FABIÁNEK P. (ed) 2004: *Monitoring stavu lesa v České republice 1984 – 2003*. Praha, MZe ČR, VÚLHM Jíloviště-Strnady: 20-35.
- FELLNER R. 1989: Mycorrhizae - forming fungi as bioindicators of air pollution. *Agric. EcoSyst. Environm.*, 28: 115-120.
- FELLNER R. 1993: Air pollution and mycorrhizal fungi in Central Europe. pp. 239-250. In: PEGLER D.N., BODDY L., ING B., KIRK P.M. (eds.): *Fungi of Europe: Investigation, recording and conservation*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- FELLNER R., KOUBA F., LANDA J., PEŠKOVÁ V., SOUKUP F., JAVŮREK M. 1995: Monitorování vlivu vápnění a kapalného hnojení na mykorhizní poměry ve smrkových porostech v Krkonoších – 4. [Etapová zpráva za léta 1992 – 1995]. VÚLHM Jíloviště-Strnady, 186 pp.
- FELLNER R. & LANDA J. 2000: Změny v rozšíření hub (makromycetů) v krkonošských lesích v posledních desetiletích. *Opera Corcontica*, 36: 446-452.
- FELLNER R. & LANDA J. 2003: Mycorrhizal revival: case study from the Giant Mts., Czech Republic. *Czech Mycol.*, 54, (3-4): 193-203.
- FELLNER R. & PEŠKOVÁ V. 1995: Effects of industrial pollutants on ectomycorrhizal relationships in temperate forests. *Can. J. Bot.*, 73 (Suppl. 1): 1310-1315.
- FELLNER R. & SOUKUP F. 1991: Mycological monitoring in the air-polluted regions of the Czech Republic. *Commun. Inst. Forest. Cech.*, 17: 125-137.
- GULDEN G., HOILAND K., BENDIKSEN K., BRANDRUD T.E., FOSS B.S., JENSSEN H.B., LABER D. 1992: Fungi and air pollution. *Mycocoenological studies in three oligotrophic spruce forests in Europe. Biblioth. Mycol.*, 144: 1-81.
- JAKUCS P., MESZAROS I., PAPP B.L., TOTTH J.A. 1986: Acidification of soil and decay of sessile oak in the „Sikfokut project“ area (N-Hungary). *Acta Bot. Hung.*, 32: 303-322.
- JANSEN A.E. 1991: The mycorrhizal status of Douglas fir in the Netherlands: its relation with stand age, regional factors, atmosphere pollutants and tree vitality. *Agric. EcoSyst. Environm.*, 35: 191-208.
- KREISEL H. (ed.) 1987: *Pilzflora der Deutschen Demokratischen Republik. Basidiomycetes*. Jena.
- Last F.T., Pelham J., Mason P.A., Ingleby K. 1979: Influence of leaves on sporophore production by fungi forming sheathing mycorrhizas with *Betula* spp. – *Nature (London)* 280: 168-169.
- LEGON N.W. & HENRICI A. 2005: *Checklist of the British & Irish Basidiomycota*. Kew, Royal Botanic Gardens.
- LEPŠOVÁ A., CUDLÍN P., KRÁLOVÁ M. 1987: Ektomykorhizní houby smrku ztepilého v imisních oblastech Šumavy, Krušných hor a Krkonoš. pp. 104-119. In: *Ekologie mykorrhiz a mykorrhizních hub. Sborník referátů*, DT ČSVTS, Pardubice.
- MALENOVSKÝ Z., CUDLÍN P., ZEMEK F. 2000: Vzájemné vztahy faktorů a složek horských smrkových ekosystémů v Krkonoších analyzované metodou „MINI GIS“. *Opera Corcontica*, 36: 492-498.
- NESPIAK A. 1971: Grzyby wyzsze regla górnego w Karkonoszach. *Acta Mycol.*, 7 (1): 87-98.
- PEŠKOVÁ V. 2000: Odběry a rozборы kořenů pro studium mykorhizních poměrů v lesních porostech. *Zpravodaj ochrany lesa*, VI, (8): 9-10.
- PEŠKOVÁ V. & SOUKUP F. 2006a: Houby v lesních porostech na bývalých zemědělských půdách. Metodické přístupy k studiu jejich role. pp. 127-133. In: Neuhöferová, P. (eds.): *Zalesňování zemědělských půd, výzva pro lesnický sektor*. Kostelec nad Černými lesy, ČZU v Praze a VS Opocno.
- PEŠKOVÁ V. & SOUKUP F. 2006b: Houby vázané na kořenové systémy: Metodické přístupy ke studiu. Review. *Zprávy lesn. výzkumu*, 51 (4): 61-68.
- RÖSEL K. & REUTHER M. 1995: *Differentialdiagnostik der Schäden an Eichen in den Donauländern*. Neuherberg, GSF-Bericht, 403 pp.

- SCHLECHTE G. 1986: Zur Mykorrhizapilzflora in geschädigten Forstbeständen. Mykol., 52: 225-232.
- SOUKUP F., LIŠKA J., KNÍŽEK M., PEŠKOVÁ V. 2001: Zdravotní stav dubů v ČR a jeho ohrožení houbovými a hmyzími škůdci. [Výroční zpráva projektu NAZV QD 0332]. VÚLHM Jíloviště-Strnady, 23 pp.
- SOUKUP F., PEŠKOVÁ V., LIŠKA J., KNÍŽEK M. 2002: Zdravotní stav dubů v ČR a jeho ohrožení houbovými a hmyzími škůdci. [Výroční zpráva projektu NAZV QD 0332]. VÚLHM Jíloviště-Strnady, 32 pp.
- SOUKUP F., PEŠKOVÁ V., LIŠKA J., KNÍŽEK M. 2003: Zdravotní stav dubů v ČR a jeho ohrožení houbovými a hmyzími škůdci. [Závěrečná zpráva projektu NAZV QD 0332]. VÚLHM Jíloviště-Strnady, 45 pp.
- TERMORSHUIZEN A.J. & SCHAFFERS A.P. 1987: Occurrence of carpophores of ectomycorrhizal fungi in selected stands of Pinus sylvestris in the Netherlands in relation to stand vitality and air pollution. Pl. & Soil, 104: 209-217.
- VACEK S. & MATĚJKA K. 1999: The state of forest stands on permanent research plots in the Krkonoše Mts. in years 1976 – 1997. J. For. Sci., 45: 291-315.
- VACEK S., MATĚJKA M., SIMON J., MALÍK V., SCHWARZ O., PODRÁZSKÝ V., MINX T., TESAŘ V., ANDĚL P., JANOVSKÝ L., MIKESKA M. 2007: Zdravotní stav a dynamika lesních ekosystémů Krkonoš pod stresem vyvolaným znečištěním ovzduší. Folia Forestalia Bohemica. Kostelec nad Černými lesy, Lesnická práce, s.r.o., 4: 216 pp.

Kontakt

Vítězslava Pešková, František Soukup
Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti v.v.i.,
Strnady 136, Jíloviště, 156 04 Praha 5 – Zbraslav
e-mail: peskova@vulhm.cz, soukup@vulhm.cz

STAV SMRKOVÝCH KULTUR PO APLIKACI MYKORHIZNÍHO PŘÍPRAVKU

Libuše Vostrá¹, Jaroslav Holuša^{1,2}

¹Fakulta lesnická a dřevařská, Česká zemědělská univerzita

²Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.

Úvod

Východní část České republiky je postižena rozpadem smrkových porostů. Lesy stresované suchem (Stavovský 2002) jsou následně napadány václavkou smrkovou (HOLUŠA & LIŠKA 2002). Oslabené stromy jsou kolonizovány lýkožrouty (HOLUŠA & LIŠKA 2002). Jedná se především o Ostravskou pánev, Podbeskydskou pahorkatinu, Nízký Jeseník, ale také o oblasti vyšších nadmořských výšek ve Slezských Beskydech (ŠRÁMEK et al. 2008) či Hrubém Jeseníku. Chřadnoucí stromy jsou aktivně vyhledávány a následně káceny a asanovány. Na některých místech již smrk úplně vymizel z dřevinné skladby. Řešením je přeměna smrkových porostů na smíšené listnaté lesy.

V ohrožených lokalitách jsou vysazovány přednostně listnáče a je usilováno co nejvíce se přiblížit přirozené dřevinné skladbě. I když hlavním cílem je změna dřevinné skladby, určitou možností jako ochrana proti václavce by mohlo být ošetření kořenového systému sazenic smrku mykorhizními přípravky. Ty mohou zlepšit uchycení sazenic, zvýšit jejich biologickou kvalitu a rezistenci k vnějším stresům. Kořínky by tak byly obsazeny mykorhizními houbami a zabránilo by se napadení václavkou. Mykorhizních přípravků je využíváno v lesnictví, školkařství, zahradnictví a zemědělství při rekultivaci půd, osazování svahů a okrajů silnic, výsadbě městské zeleně, pěstování léčivých rostlin atd.

V tomto příspěvku uvádíme předběžné výsledky poloprovozních pokusů, ve kterých jsme

- srovnali růst a vývoj ošetřených (inokulovaných) a neošetřených (kontrolních) sazenic smrku ztepilého (*Picea abies*) mykorhizním přípravkem a
- a stanovili míru obsazení kořenů mykorhizními houbami.

Podrobné výsledky jsou připraveny do tisku ve vědeckém časopise (VOSTRÁ ET AL. in prep.).

Metodika

Sazenice smrku ztepilého byly ošetřeny ektomykorhizním přípravkem Ectovit® (výrobce Symbiom s.r.o.) na majetku Městských lesů Opava (k.ú. Skřipov). Ectovit je očkovací látka obsahující ektomykorhizní houby a další dvě složky pevné nosiče (směs Perlitu a jemné rašeliny) obsahující spóry ektomykorhizních hub (*Scleroderma* spp. a *Pisolithus* spp.) a směsi přírodních látek podporující vznik mykorhizní symbiózy (výtažky z mořských řas, přírodní zdroje dusíku, hořčíku a draslíku). Druhou složkou je tekuté médium v polyetylenových sáčcích, které obsahuje sterilně pěstované mycelium dalších ektomykorhizních hub (*Laccaria* spp., *Boletus* spp. aj.), vybraných podle druhu cílové dřeviny (<http://www.symbiom.cz/eshop/index.php>).

Na celkem 10 holinách malého rozsahu (<0,5 ha), které vznikly vytěžením odumřelých částí smrkových lesů, bylo mykorhizním přípravkem ošetřeno celkem 50 dvouletých sazenic, které byly vysázeny v pěti řadách 1.-7.5.2004. Paralelně bylo vysázeno pět řad sazenicemi neošetřenými Ectovitem.

V období 26. do 28. září 2008 bylo na pěti plochách v nadmořských výškách 400-500 m n.m. (SLT 4B a 4O), které bylo možno vyhodnotit a nebyly zničeny při dalších lesopěstebních opatřeních provedeno vyhodnocení úmrtnosti a stavu smrkových sazenic (výška, tloušťka kořenového krčku). Na každé ploše bylo proměřeno dvacet sazenic (pět v každé řadě), výška tloušťka kořenového systému a byla sledována mortalita. Z každé plochy byly odebrány čtyři ošetřené a čtyři kontrolní sazenice (celkem 40) z centrální části pěti řad pro laboratorní zhodnocení parametrů sazenic (výška nadzemní části, maximální délka kořene, tloušťka kořenového krčku, hmotnost sušiny nadzemní části a kořene) a mykorhizních poměrů. Vlastní vyhodnocení mykorhizních poměrů bylo provedeno standardní metodou identifikace všech aktivních a neaktivních mykorhizních špiček (PEŠKOVÁ & SOUKUP 2006). Hlavní jednotkou při stanovení počtu mykorhiz byl segment kořenu 5 cm dlouhý, o průměru do 1 mm. Takto bylo vyhodnoceno 20 kořenových segmentů na každém kořenovém systému. Počty jednotlivých typů mykorhizních špiček byly určovány pod binokulární lupou podle následujících diagnostických znaků: do skupiny „aktivních mykorhiz“ byly řazeny špičky s vyvinutým houbovým pláštěm, Hartigovou sítí, s vysokým turgorem, postřádající kořenové vlášení, na povrchu hladké, světlejší barvy. Naopak špičky, u nichž byla patrná výrazná ztráta turgoru, které byly na povrchu svraskalé, chyběl jim houbový plášť a Hartigova síť, byly zařazeny do skupiny „neaktivních mykorhiz“.

Úroveň mykorhizních vztahů pak byla hodnocena s využitím dvou parametrů: hustota mykorhizních špiček a jejich procentuální podíl. Hustota aktivních a neaktivních mykorhiz byla počítána jako průměrná hodnota zjištěného počtu mykorhiz vztažená na 1 cm délky kořene. Procentuální podíl mykorhiz byl kalkulován jako poměr aktivních a neaktivních mykorhiz z celkového počtu všech nalezených mykorhiz.

Naměřené parametry inokulovaných a kontrolních smrkových sazenic v terénu i v laboratoři byly testovány párovým t-testem a stejně jako počty přeživších sazenic, pro které byl použit Mann-Whitneyův U test, byly provedeny v programu Statistica 8.0.

Výsledky

Výška smrkových sazenic naměřená v terénu se pohybovala od 99 cm do 140 cm. V případě kontrolních sazenic byla průměrná výška 103,5 cm a byla signifikantně nižší než u sazenic inokulovaných, 133,5 cm ($t=-8,01713$; $p<0.01$; obr. 1). Výška nadzemní části sazenic naměřená v laboratoři se pohybovala od 70,3 cm do 96,5 cm a v případě kontrolních sazenic byla průměrná výška 77,8 cm také průkazně nižší než u inokulovaných 90,6 cm ($t=-2,67408$; $p<0.05$).

Tloušťka kořenového krčku smrkových sazenic naměřené v terénu se pohybovala od 18,6 mm do 27,3 mm a kontrolní plochy vykazovaly průměrnou hodnotu 19,4 mm, což je signifikantně méně než u inokulovaných 26,1 mm ($t=-9,08212$; $p<0.01$; obr. 2).

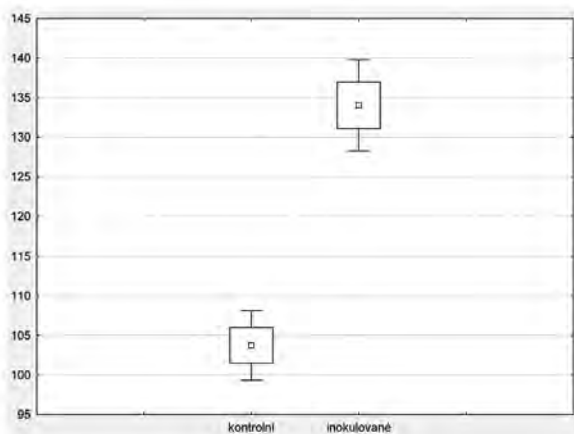
Tloušťka kořenového krčku smrkových sazenic naměřené v laboratoři se pohybovala od 16,3 mm do 21,5 mm a kontrolní plochy vykazovaly průměrnou hodnotu 18,1 mm a inokulované 19,7 mm. Průměry nejsou signifikantně rozdílné ($t=-1,17472$; $p>0.10$).

Max. délka kořene smrkových sazenic naměřené v laboratoři se pohybovala od 25,6 cm do 41,3 cm a v případě kontrolních sazenic byla průměrná délka 29,6 cm a inokulovaných 37,3 cm ($t=-2,77942$; $p<0.01$; obr. 3).

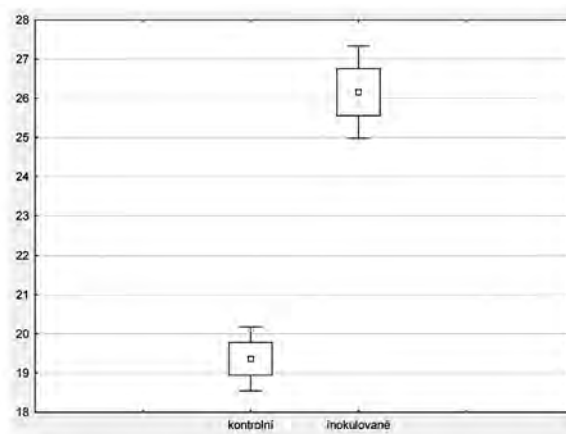
Procentuální podíl aktivních mykorhiz se pohyboval od 32% do 70%. Podíl aktivních mykorhiz na kontrolních plochách byl 38% na inokulovaných 64% (obr. 4). Procentuální podíl aktivních mykorhiz dosahoval signifikantně vyšších hodnot u ošetřených smrkových sazenic ($t=-6,50379$; $p<0.01$).

Průměrná hmotnost sušiny nadzemní části u kontrolních sazenic byla 131,02 g a u inokulovaných 181,95 g a průměrná hodnota hmotnosti kořenového systému byla u kontrolních sazenic 25,98 g a u inokulovaných 37,66 g.

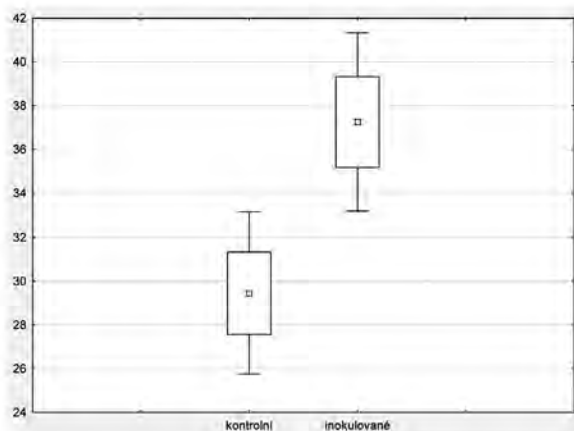
Na všech lokalitách byla ujímavost kontrolních sazenic nižší než sazenic inokulovaných. Celkem se z kontrolních sazenic ujalo 77% a ze sazenic inokulovaných 86%. Průměrné počty jsou signifikantně rozdílné ($Z=-2,61116$; $p<0.01$).



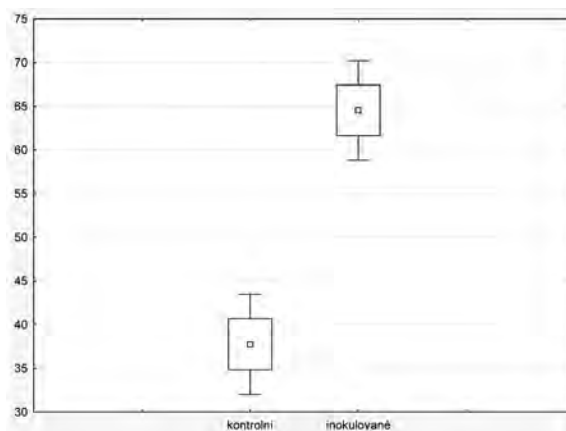
Obr. 1: Průměrné (\pm SE, \pm SD) výšky nadzemní části smrkových sazenic (cm)



Obr. 2: Průměrné tloušťka (\pm SE, \pm SD) kořenového krčku smrkových sazenic (mm)



Obr. 3: Průměrná maximální (\pm SE, \pm SD) délka kořene smrkových sazenic (cm)



Obr. 4: Průměrný procentuální (\pm SE, \pm SD) podíl aktivních mykorhizních špiček (AM) (%)

Diskuse

Pozitivní vliv umělé inokulace semenáčků mykorhizními houbami je prokázán ve sterilních kulturách nebo hrncových i polních pokusech (CUDLÍN ET AL. 1983, DIXON ET AL. 1998, HATCH 1937, KROPÁČEK 1987, 1989, MORTIER ET AL. 1989, KOWALSKI 2007, MORTIER ET AL. 1988, PARKE ET AL. 1984, SZABLA 2005, THEODOROU 1968, AJ.). Smrkové sazenice ošetřené přípravkem Ectovit dosáhly větších dimenzí, a to jak výšky sazenic, tak tloušťky kořenového systému). Průkazný není rozdíl v kořenových krčcích u sazenic měřených v laboratoři, neboť podlely negativnímu výběru, protože pro studium mykorhizních špiček byly odebrány sazenice menších dimenzí). Tento efekt je nejspíše obecný. Vyšší hodnoty výšky sazenic u mykorhizovaných sazenic byly prokázány u několika dřevin (SZABLA 2005). Hustota aktivních mykorhiz i procentuální podíl aktivních mykorhiz byl prokazatelně vyšší u inokulovaných sazenic. Výsledky byly průkazné, i přesto, že půdy na zalesňovaných plochách obsahují oproti umělým substrátům autochtonní ektomykorhizní houby a celou řadu mikroorganismů s potenciálními symbiotickými vztahy, které mohou vytvořit nekontrolovatelné interakce, ovlivnit růst sazenic a zastřít případně i rozdíl mezi očkovánými a kontrolními variantami (GRYNDLER 2004). K spontánnímu vzniku mykorhiz tak dochází i u neočkovaných kontrol, které v některých pokusech vykazovaly i vyšších průměrných hodnot (CAISOVÁ 1994). Proměnlivost výskytu těchto mikroorganismů v přirozených podmínkách i v závislosti na půdních poměrech a také vliv neopakovatelných klimatických podmínek

po několik testovaných vegetačních období jsou hlavními příčinami velkých rozdílů u experimentálně získaných výsledků s umělou inokulací semenáčů a sazenic (PEŠKOVÁ 2000). Hustota mykorhiz je ovlivněna především dlouhodobě existujícími lokálními podmínkami, zatímco procentuální podíl mykorhiz je patrně citlivěji reagující na okamžité změny, jako je např. vláhový stres, zhoršení imisní situace atd.(FELLNER & PEŠKOVÁ 1995; PEŠKOVÁ 2006).

Jedním z hlavních cílů umělé inokulace je úspěšné přežití sazenic po přesazení a stimulace jejich dalšího efektivního růstu ve stresových podmínkách (SZABLA 2005), který vede k zlepšení zdravotního stavu a odolnosti vůči různým abiotickým a biotickým činitelům.

Umělá inokulace resp. ošetření smrkových sazenic mykorhizním přípravkem pozitivně podpořila ujmavost, růst a vývoj smrkových sazenic, kdy sazenice na ošetřených plochách vykazovaly ve většině hodnotících parametrů lepších výsledků než kontrolní sazenice. Na základě vyhodnocení tohoto pokusu lze metodu umělé inokulace sazenic pro lesnickou praxi doporučit (po provedení kalkulace ekonomických nákladů) i v inkriminované oblasti. Další vývoj a případně lepší přežívání jedinců smrku je nutno vyhodnotit po delší době.

Poděkování

Příspěvek byl částečně financován v rámci řešení výzkumného záměru MZe 0002070203 „Stabilizace funkcí lesa v antropogenně narušených a měnících se podmínkách prostředí“.

Literatura

- CAISOVÁ V. 1994: Hodnocení mykorhizace sazenic smrku pichlavého (*Picea pungens*) po aplikaci tekutého a suchého inokula lakovky (*Laccaria proxima*), práce VÚLHM 79: 117-123.
- CUDLÍN P., MEJSTŘÍK V., SKOUPÝ J. 1983: Effect of pesticides on ectomycorrhizae of *Pinus sylvestris* seedlings. - *Plant Soil* 71: 353 – 361.
- DIXON R.K., GARRETT H.E. COX G.S., MARX D.H., SANDER I.L. 1984: Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. I. Inoculation success and seedling growth relationships. *Forest. Sci.* 30 (2): 364-372.
- FELLNER R. & PEŠKOVÁ V. 1995: Effects of industrial pollutants on ectomycorrhizal relationships in temperate forests.- *Can. J. Bot.*, 73 (Suppl. 1): 1310-1315
- GRYNDLER M., BALÁŽ M., HRŠELOVÁ H., JANSÁ J., VOSÁTKA M. 2004: Mykorhizní symbióza. O soužití hub s kořeny rostlin. - *Academiae Praha*, 366 s.
- HATCH A.B. 1937: The physical basis of mycotrophy in genus *Pinus*. *Black Rock For.Bull.* 6, 168 s.
- KOWALSKI S. (ed.) 2007: Ektomikoryzy. Nowe biotechnologie w polskim szkółkarstwie leśnym. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych, Warszawa, 398 s.
- KROPÁČEK K. 1987: Testování granulovaného inokula za sterilních a polosterilních podmínek. pp. 65-71. In: *Ekologie mykorhiz a mykorrhizních hub. Sborník referátů, DT ČSVTS, Pardubice.*
- KROPÁČEK M.1989: Umělá mykorrhizace sadebního materiálu lesních dřevin. - Kandidátská disertace VŠZ Praha, rukopis, 145 s.
- MORTIER F., LE TACON F., GARBAYE 1988: Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Ann. Sci. For.* 45 (4): 301-310.
- MORTIER F., LE TACON F., GARBAYE J. 1989: Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas-fir in a nursery. *Agric., Ecosystems Environ.* 28: 351-354.
- PARKE J.L., LINDERMAN R.G., TRAPPE J.M. 1984: Inoculum potential of ectomycorrhizal fungi in forest soils of Southwest Oregon and Northern California. *Forest. Sci.* 30 (2): 300-304.
- PEŠKOVÁ V. 2000: Mykorhizní inokulace, cesta, jak zlepšit ujmavost sazenic. *Lesnická práce*, 79 (3): 120-121.
- PEŠKOVÁ V. 2006: Mykoflóra kořenových systémů lesních dřevin. Disertační práce – ČZU v Praze, Fakulta lesnická a environmentální. 84 s.
- SZABLA K. 2005: Mikoryzacja sadzonek a efekty hodowlane w uprawach. [Autoreferát disertační práce]. Dyrekcji Generalnej Lasów Państwowych Warszawa, 67 pp.

ŠRÁMEK V., SOUKUP F., SLODIČÁK M., HELLEBRANTOVÁ K., LOCHMANOVÁ Z., NOVOTNÝ R., OCEÁNSKÁ Z., PEŠKOVÁ V., VÍCHA Z., VEJPUŠKOVÁ M., VORTELOVÁ L. 2008: Chřadnutí lesních porostů na LS Jablunkov. Dílčí technická zpráva III a realizační výstup II, - Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, Strnady, 55 s.

THEODOROU C. 1968: Inositol phosphate in needles of Pinus Radiata D. Don. And the phytase activity of mycorrhizal fungi. Proc. Congr. Soil Sci. 3, 483-493,

VOSTRÁ L., HOLUŠA J., PEŠKOVÁ V. in prep.: Impact of mykorhizial inoculation on spruce samplings: comparison of five years experiment in forests infested by honey fungus. J. For. Sci

Kontakt

Libuše Vostrá¹, Jaroslav Holuša^{1,2}

¹Fakulta lesnická a dřevařská, Česká zemědělská univerzita, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchdol

²Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i.

Pracoviště Frýdek-Místek, Nádražní 2811, 73801 Frýdek-Místek

e-mail: holusaj@seznam.cz

APLIKACE PCR TECHNIK VE STUDIU BIODIVERZITY MYKORHIZNÍCH HUB

Vladislav Čurn¹, Barbora Kubátová¹, Miloslava Kavková²,
Vendula Endrychová¹

¹JU v Českých Budějovicích, Biotechnologické centrum

²JU v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Úvod

Mykorhizní houby jsou heterogenní skupinou asi 6000 druhů náležejících do pododdělení *Zygomycotina*, *Ascomycotina* a *Basidiomycotina*. Jsou rozděleny do množství různých skupin závislých na jejich vztazích s hostitelskými rostlinami, které zahrnují asi 240 000 druhů. Mykorhizní houby osídlují v průběhu svého životního cyklu různé přírodní niky: jako spóry, hyfy a propagule spočívají ve rhizosféře, v průběhu své interakce s kořeny obývají rhizoplán a nakonec se během symbiotické fáze vyvíjejí uvnitř kořenových tkání (BIANCOTTO a BONFANTE 1998). Navzdory diverzitě taxonů nesou mykorhizní houby důležité znaky. Žijí v těsném spojení s kořeny rostlin a zásluhou tohoto symbiotického vztahu úspěšně dokončují svůj životní cyklus. V průběhu vzájemného působení se vyskytuje obousměrný přenos minerálních živin a uhlíku, zajišťující mezi partnery kontinuální tok živin (SMITH a READ 1997).

Existuje řada studií, týkajících se molekulárních, buněčných a fyziologických aspektů mykorhizních hub (ALLEN 1992; GIANINAZZI a SCHUEPP 1994; BONFANTE a PEROTTO 1995; MARTIN a kol. 1995; HARRISON 1997). Důležitý agrobiotechnologický význam pro low-input zemědělství mají pozitivní účinky mykorhizních hub na výživu a zdraví rostlin i půdní stabilitu. Nicméně předchozí znalost biologické diverzity mykorhizních hub ve rhizosféře je důležitá pro potenciální využití těchto hub v agrobiotechnologických systémech. Například fyziologické znaky a užitečnost mykorhizních hub se velmi liší, což závisí na jejich taxonomickém zařazení a někdy dokonce na vlastnostech jednotlivého izolátu.

Techniky založené na PCR jsou používány jako molekulární nástroj pro identifikaci endo- i ektomykorhizních hub, kdykoliv chybí nebo jsou nejasné jejich morfologické charakteristiky. Používají se také k prověření vztahů mezi velmi příbuznými druhy a populacemi jednotlivých druhů a úroveň rozlišení obvykle přesahuje schopnost klasických morfologických studií (LANFRANCO a kol. 1998). Udává se, že více než 5000 druhů ektomykorhizních hub je asociováno se sekundárními kořeny *Gymnosperm* a *Angiosperm* (MOLINA a kol. 1992). Jedním z hlavních cílů současného výzkumu je porozumět struktuře a dynamice těchto houbových společenství (DAHLBERG a STENLID 1995). Ektomykorhizní houby ve skutečnosti projevují velkou diverzitu dokonce i v malých monokulturních lesích, které jsou osídleny 20-35 druhy hub (BRUNS 1995). Dříve než byly do studia této oblasti zavedeny PCR metody, byla většina studií zaměřena na přítomnost plodnic (sporangiu) s předpokladem, že jejich produkce odráží zastoupení symbiotického mycelia (DAHLBERG a STENLID 1995). Technika založené na analýze DNA skýtají jisté výhody, neboť mohou využít jakékoliv stádium životního cyklu mykorhizních hub, včetně plodnic, mykorhiz, extraradikálního mycelia a izolovaného mycelia rostoucího *in vitro*. K identifikaci ektomykorhizních hub jsou používány jaderné a mitochondriální geny kódující strukturální rRNA nebo mikrosatelity (GARDES a kol. 1991, BRUNS a GARDES 1993). Alternativní metodou je PCR amplifikace „single-copy“ genů. Například KREUZINGER a kol. (1996) úspěšně používali tuto metodu pro 1,2 kb fragment genu kódující glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu.

Techniky založené na PCR pomáhají zodpovědět mnoho významných otázek týkajících se fylogeneze, identifikace a polymorfismu mykorhizních hub. Je zkoumán rozsah diverzity přírodních

populací mykorrhizních hub, který se nakonec ukázal větší než se původně předpokládalo. Často je přítomno několik symbiotických hub nejenom v tomtéž prostředí, ale i na jednom kořeni bez ohledu na jeho velikost. Dobrým znázorněním tohoto fenoménu jsou slabé kořínky zástupců řádu *Ericales*. Hodnocena je jak dynamika místních populací hub, tak i výsledek introdukce kmenů vybraných díky svým fyziologickým vlastnostem. Je evidentní, že schopnost těchto kmenů přežít závisí na okolním prostředí i na jejich interakci s ostatními půdními mikroorganismy.

Cílem studie bylo využití techniky PCR-RFLP a sekvenování jaderného ITS regionu pro účely identifikace mykorrhizních hub.

Materiál a metody

Vzorky ektomykorrhizních hub analyzované v této studii přísluší k čeledi *Cortinariaceae* (Tab. 1) a byly morfologicky určeny Mgr. Miroslavem Beranem (Jihočeské muzeum v Českých Budějovicích) a RNDr. Annou Lepšovou, CSc. (PřF JU).

Tab. 1: Vzorky ektomykorrhizních hub asociovaných s kořeny smrku z Krkonoš.

Označení	Vzorek	Morfologické určení
PCH 1 K PCH 1 PL	ektomykorrhizní špička plodnice	<i>Cortinarius cinnabarinus</i>
PCH 2 K PCH 2 PL	ektomykorrhizní špička plodnice	<i>Dermocybe bataillei</i>
PCH 13 K PCH 13 PL	ektomykorrhizní špička plodnice	<i>Cortinarius brunneus</i>
PCH 18 K PCH 18 PL	ektomykorrhizní špička plodnice	<i>Cortinarius</i> sp.
PCH 27 K PCH 27 PL	ektomykorrhizní špička plodnice	<i>Cortinarius</i> sp.
PCH 31 K PCH 31 PL	ektomykorrhizní špička plodnice	<i>Cortinarius</i> sp.

Extrakce DNA

Genomická DNA byla extrahována z čerstvé biomasy pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Pro DNA extrakci bylo použito přibližně 100mg biomasy, získané z plodnic nebo mykorrhizních špiček. Vzorky DNA byly uchovávány při -20°C.

ITS -RFLP analýza

Protokol ITS-RFLP analýzy byl modifikován z metodiky práce GARDES a BRUNS (1996). Pro PCR byly použity univerzální primery ITS1 a ITS4 (WHITE a kol. 1990). Amplifikace DNA probíhala v termocykleru PTC - 100 (MJ RESEARCH) s následujícími parametry: 94°C (2 min) pro počáteční separaci DNA řetězců a 35 cyklů: 94°C (30 sek.) - denaturace, 62°C (3 min) - annealing primerů, 72°C (1 min) - elongace. Termální cyklus byl zakončen elongační teplotou 72°C (10 min). Amplifikované ITS produkty byly použity pro RFLP analýzu. Digeste amplifikovaných fragmentů DNA se prováděla pomocí různých restričních endonukleáz (*MboI*, *HinfI* a *EcoRI*) tak, že 15 µl PCR produktu bylo smícháno s 2 µl RE bufferu, 0,5 µl restriční endonukleázy a doplněno 2,5 µl H₂O do konečného objemu 20 µl.

Směs byla inkubována v termocykleru 6 hod při 37°C. Produkty po štěpení byly separovány pomocí PAGE (10% polyakrylamidový gel v TBE pufru) a detekovány ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla 6 hodin při napětí 150 V. Gely byly fotografovány pod UV světlem. Získané elektroforeogramy byly zpracovávány pomocí speciálního software - *BioProfil 1D++* pro vyhodnocování molekulárních dat.

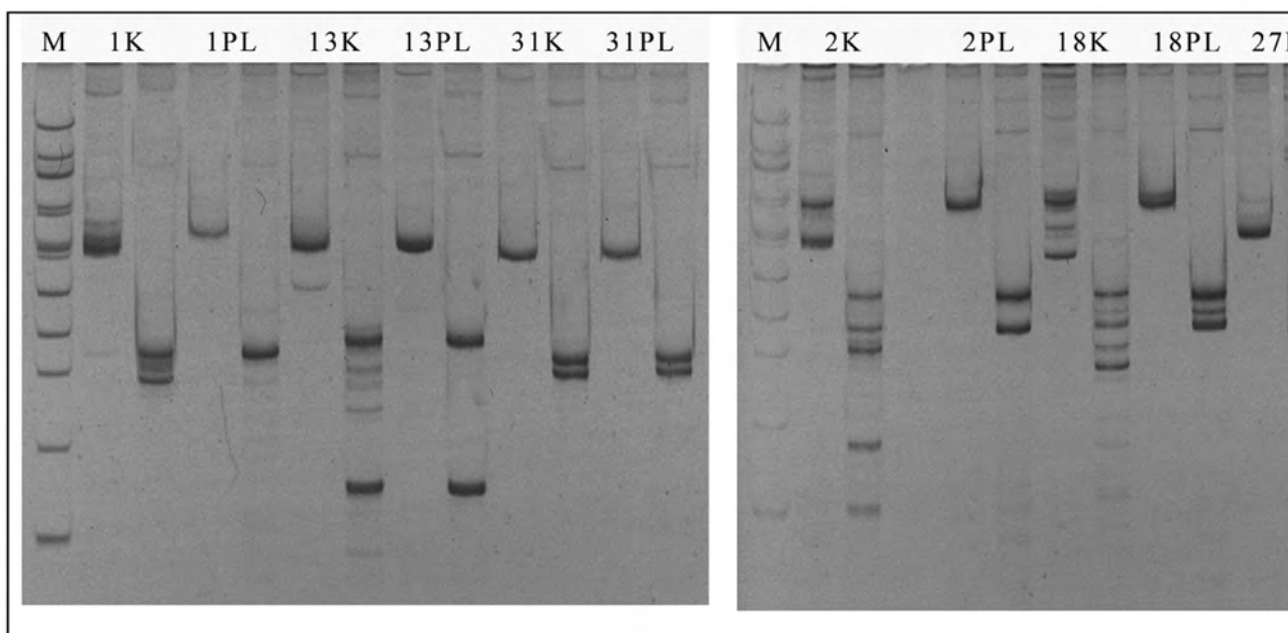
Sekvenování DNA a fylogenetická analýza

PCR fragmenty (ITS) byly vyříznuty z agarozového gelu, přečištěny (JETQUICK Gel Extraction Spin Kit, KRD) a naligovány do plasmidového vektoru pCR4®-TOPO® pomocí kitu TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) podle instrukcí uvedených v návodu kitu. Rekombinantní plasmidy byly použity k transformaci TOPO tepelně kompetentních buněk *Escherichia coli*. Plasmidová DNA byla purifikována pomocí kitu Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit (Invitek) podle standardního protokolu.

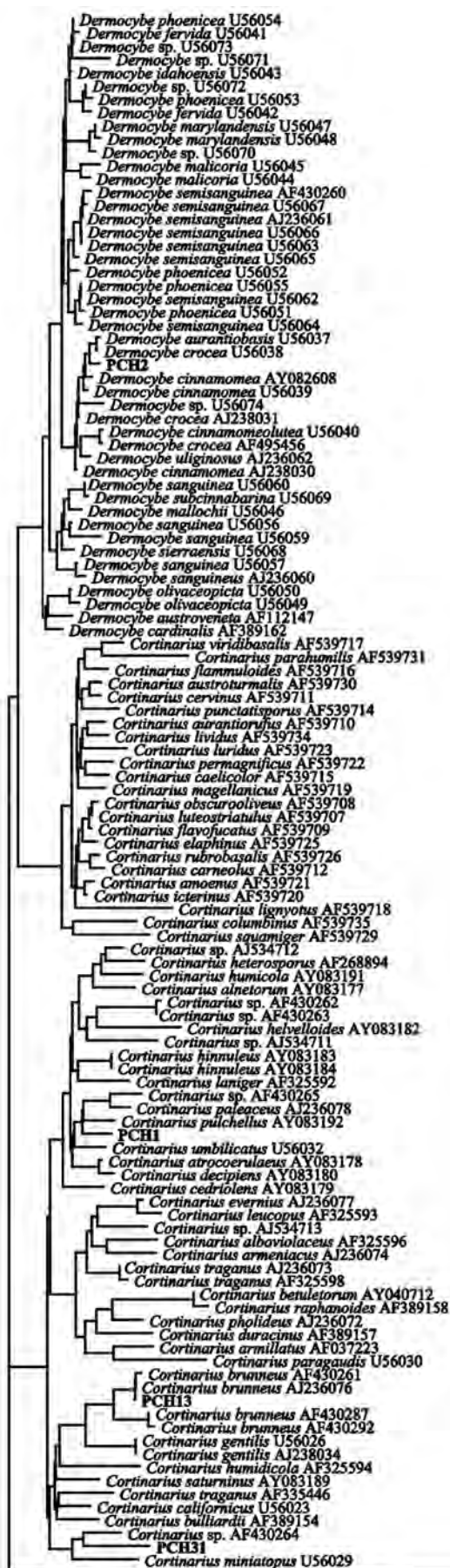
Sekvenování DNA bylo provedeno v Laboratoři speciálních technik molekulární biologie (Masarykova univerzita, Brno) pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 (Perkin Elmer). Sekvenování proběhlo za použití univerzálních primerů M13rev a T7. Získané nukleotidové sekvence byly porovnávány se sekvencemi uloženými v *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nih.gov>) pomocí programu BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL a kol. 1997). Pro mnohonásobné seřazení sekvencí (*multiple alignment*) byl použit program ClustalX (1.81) (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>). Distanční fylogenetické stromy byly sestaveny pomocí programu PAUP 4.10b (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD 2002), metodou minimální evoluce s evolučním modelem HKY85.

Výsledky a diskuse

Cílem této studie bylo ověření identifikace ektomykorhizních hub izolovaných z kořenů smrku, resp. určení houby, která vytváří v blízkosti stromu plodnici podílející se na mykorhize. Obr. 1 demonstruje výsledky ITS-RFLP analýzy u 6ti dvojic ektomykorhizní špička-plodnice. Z výsledků analýzy vyplývá, že v „jasných“ případech lze určit přímou souvislost mezi touto dvojicí – např. vzorek PCH 31, kde se výsledné spektrum restričních fragmentů zcela shoduje u obou analyzovaných vzorků (ektomykorhizní špička i plodnice) a u všech použitých restričních endonukleáz. Naopak u dvojic PCH 2, PCH 13, PCH 18 je patrné, že daná houba se podílí na mykorhize, ale restriční spektrum ze vzorku ektomykorhizní špičky je bohatší a na mykorhize se podílí ještě další druh houby. Vzorek PCH 1 pak ukazuje případ, kdy jak amplifikace ITS regionu, tak výsledky restričního štěpení amplifikovaného produktu poskytují zcela odlišné výsledky a tyto dva vzorky dané dvojice si neodpovídají, tj. na mykorhize se podílí zcela odlišné druhy hub, než jaké byly sebrány ve formě plodnic. Tento výsledek byl pak potvrzen pomocí sekvenování (viz. Obr. 2 a Obr. 3).

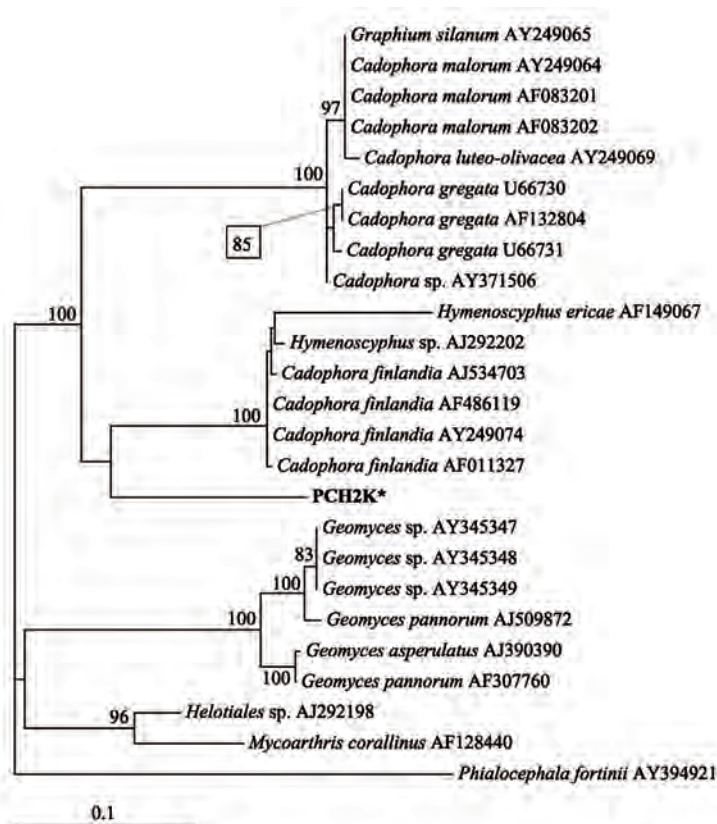


Obr. 1: Výsledky ITS-RFLP analýzy u ektomykorhizních hub pocházejících z Krkonoš, štěpení pomocí restriční endonukleázy *Hinf*I.



Analyzované vzorky PCH 1, PCH 2, PCH 13 a PCH 31 jsou vyznačeny tučně. K zakotvení stromu byla použita sekvence druhu *Pisolithus tinctorius* (AF004735). Měřítko označuje 0,1 substitucí na danou vzdálenost.

Obr. 2: Distanční fylogenetický strom pro vybrané druhy hub rodu *Cortinarius* založený na sekvencích ITS 1, ITS 2 a genu 5,8S rDNA.



Obr. 3: Distanční fylogenetický strom založený na sekvencích ITS 1, ITS 2 a genu 5,8S rDNA pro vzorek PCH 2K* a jeho příbuzné druhy hub ze třídy Ascomycetes. Analyzovaný vzorek PCH 2K* je vyznačen tučně. Hodnoty bootstrapu (>80%) jsou znázorněny na příslušných větvích stromu. K zakotvení stromu byla použita sekvence druhu *Phialocephala fortinii* (AY394921). Měřítka označuje 0,1 substitucí na danou vzdálenost.

V Tab. 2 jsou uvedeny velikosti úseku ITS i příslušných restrikčních fragmentů u všech dvojic ektomykorhizní špička-plodnice. Jak už bylo uvedeno, ne ve všech případech je amplifikován pouze jeden (z hlediska velikosti) ITS produkt (vzorky PCH 2, PCH 13 a PCH 18) a současně i výsledky restrikčního štěpení ukazují, že se na mykorhize podílí více druhů hub (suma velikostí fragmentů převyšuje původní velikost ITS příslušné plodnice) a pro identifikaci daného druhu mykorhizní houby je nutné provést analýzy s více restrikčními enzymy a posoudit i širší spektrum hub (plodnic). Přítomnost pravděpodobně parciálních štěpů je v této tabulce vyznačeno pomocí černých číslic. Důvodem tohoto jevu mohou být nevhodné podmínky pro reakci, případně přítomnost inhibitorů restrikčních endonukleáz ve vzorku DNA.

PCR-RFLP analýza představuje relativně rychlou metodu, nicméně ne vždy jsou všechny vzorky a restrikční fragmenty identifikované. KÅREN a NYLUND (1997) a HORTON (2002) připouštějí, že hlavním problémem metody ITS-RFLP (pokud se používá samostatně) je, že počet neidentifikovatelných vzorků zůstává poměrně vysoký, i když je k dispozici rozsáhlá ITS-RFLP databáze plodnic. To je způsobeno tím, že v rámci velkých geografických oblastí existuje určitá vnitrodruhová variabilita a velikosti fragmentů se proto různí (KÅREN a kol. 1997; METHVYN a kol. 2000; HORTON a BRUNS 2001). Metodu ITS-RFLP je tedy možné použít pouze pro první orientační hodnocení a následně je pravděpodobně nejvhodnější doplnit tuto metodu sekvenováním vzorků a jejich porovnáním s nám dostupnými daty v databázích (např. *GenBank*).

Pro další zpřesnění získaných výsledků, tj. pro doplnění morfologického popisu a ověření identifikace mykorhizních hub, byla zvolena metoda sekvenování. Byl použit celý region ITS, zahrnující oblasti ITS1, 5,8S rRNA a ITS2. Po sekvenování amplifikovaných fragmentů byly získané sekvence porovnány s dostupnými daty, tj. nukleotidovými sekvencemi v databázi *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov>). Druhy, které byly pro svou vysokou podobnost přiřazeny k příslušným analyzovaným sekvencím, byly dále použity pro sestavení fylogenetických stromů pomocí programu PAUP 4.10b.

Na Obr. 2 je prezentován distanční fylogenetický strom, který zahrnuje 113 zástupců hub rodu *Cortinarius* (plus 4 analyzované vzorky), což představuje větší rozsah druhů než uvádějí LIU a kol. (1997) a PEINTNER a kol. (2001). Vzorek PCH 1 se zařadil do skupiny s dalšími pěti druhy hub: *C. paleaceus*, *C. pulchellus*, *C. umbilicatus*, *C. atrocoeruleus* a *C. decipiens*. Podobnost nukleotidové sekvence vzorku PCH 1 byla se všemi zmíněnými druhy na úrovni 93%. U tohoto vzorku se patrně jedná o dosud neosekvenovaný druh patřící do čeledi *Cortinariaceae*. Vzorek PCH 2 se seskupil s houbami druhů *Dermocybe aurantiobasis*, *D. crocea*, *D. cinnamomea*, *D. cinnamomeolutea* a *D. uliginosus*, z nichž největší shody dosahoval s druhem *D. aurantiobasis* (U56037) a *D. crocea* (U56038), a to v obou případech 98%. Vysoká podobnost v rámci tohoto klastru pak nabízí otázku, zda se jedná skutečně o odlišné druhy, či zda by nebyla namísto reklasifikace této skupiny a využití komplexního přístupu založeného na morfologických i molekulárních datech, obdobně jak uvádí PEINTNER a kol. (2001). Fylogenetický dendrogram na Obr. 2 mimo jiné svědčí o tom, že podrod *Dermocybe* je polyfyletického původu, což souhlasí s výsledky práce LIU a kol. (1997) a naopak neodpovídá tvrzení PEINTNER a kol. (2001). Vzorek PCH 13 je s největší pravděpodobností *Cortinarius brunneus*, čemuž naznačuje jednoznačné zařazení do klastru tohoto druhu a vysoké procento podobnosti jejich sekvencí (97-98%). Vzorek PCH 31 se připojil k druhu *Cortinarius miniatopus*. U vzorku PCH 2 byl navíc sekvenován druhý amplifikovaný pruh ITS nehomologní s ITS plodnice (PCH 2K*). Takto bylo doloženo, že mykorrhizní špička může být kolonizována více druhy hub. K obdobnému zjištění dospěl i ROSLING a kol. (2003). V tomto případě se jednalo o kolonizaci houby patřící do třídy *Ascomycetes* (Obr. 3). Nejvyšší podobnost (91%) se sekvencí analyzovaného vzorku PCH 2K* vykazoval druh *Cadophora finlandia* - kmen P60 (AY249074). Na fylogenetickém stromu (Obr. 3) je patrné, že ITS sekvence houby druhu *Graphium silanum* je identická s druhem *Cadophora malorum*. Ke stejnému výsledku dospěl i HARRINGTON a kol. (2001) a HARRINGTON a McNEW (2003), ale současně vyjádřil pochybnost, zda kultura *Graphium silanum* skutečně reprezentuje druh (podobný problém popsal i pro druh *Graphium rubrum*). Stejně tak umístění *Hymenoscyphus ericae* do klastru s druhem *Cadophora finlandia* souhlasí s výsledky práce HARRINGTON a McNEW (2003), kteří uvádějí, že se jedná o „sesterské“ druhy.

Tab. 2: Velikosti neštěpených ITS úseků a jejich restričních fragmentů (bp) štěpených RE – *Hinf*I u vzorků plodnic a ektomykorrhizních špiček.

RE <i>Hinf</i> I	PCH 1K		PCH 1PL		PCH 13K		PCH 13PL		PCH 31K		PCH 31PL	
	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy
1.	727	347	756	410	673	380	673	377	597	326	607	334
2.	655	323		344	513	309		156		296		304
3.		309				241						
4.		286				157						
	PCH 2K		PCH 2PL		PCH 18K		PCH 18PL		PCH 27K		PCH 27PL	
	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy	ITS	štěpy
1.	800	458	814	458	963	463	963	460	684	362	583	332
2.	619	371		368	830	422	847	422		318		288
3.		335			724	384		378		295		
4.		310			566	323						
5.		180				276						
6.		105										

Poznámky:

K

ektomykorrhizní špička

PL

plodnice

xⁿ

zbytek neštěpeného ITS fragmentu

regular číslice

velikost pravděpodobně parciálních štěpů nebo u ITS možnost nevhodných podmínek pro reakci.

italic číslice

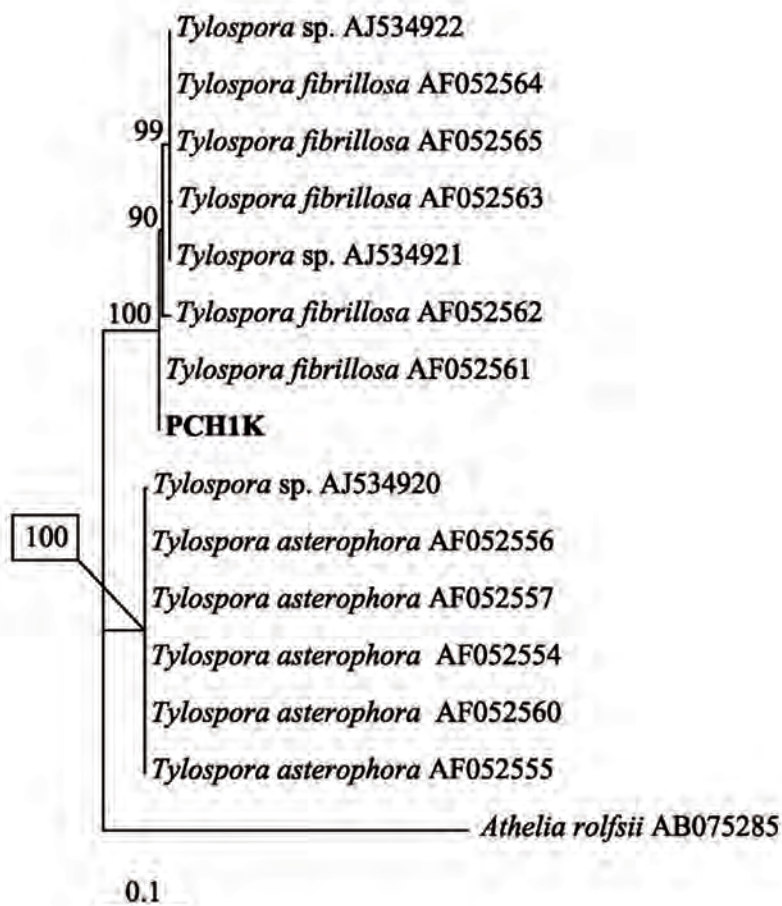
velikosti fragmentů (ITS nebo restričních štěpů) pravděpodobně sobě odpovídajících dvojic ektomykorrhizní špička-plodnice.

bold italic číslice

velikost ITS nebo restričních štěpů v pořadí druhé houby podílející se na mykorrhize.

bold číslice

velikost ITS nebo restričních štěpů houby, jež není shodná s analyzovanou plodnicí.



Obr. 4: Distanční fylogenetický strom založený na sekvencích ITS 1, ITS 2 a genu 5,8S rDNA pro vzorek PCH 1K. Analyzovaný vzorek PCH 1K je vyznačen tučně. Hodnoty bootstrapu jsou znázorněny na příslušných větvích stromu. K zakořenění stromu byla použita sekvence druhu *Athelia rolfsii* (AB075285). Měřítko označuje 0,1 substitucí na danou vzdálenost.

U všech vzorků, které byly sekvenovány, byly stanoveny sekvence jak u plodnic, tak i u odpovídajících ektomykorhizních špiček. Tímto metodickým přístupem se potvrdilo, že se u vzorku PCH 1 jedná o odlišné druhy hub, což je viditelné i na spektru fragmentů získaných po PCR-RFLP ITS regionu (Obr. 1). Ve vzorku ektomykorhizní špičky byla metodou sekvenování pravděpodobně detekována houba druhu *Tylospora fibrillosa* (Obr. 4). Nejvyšší shodu (97%) vykazoval vzorek PCH 1K s druhem *T. fibrillosa* f309, evidovaným v databázi GenBank pod označením AF052561. U ostatních vzorků (PCH 2, PCH 13 a PCH 31) byly prokázány sobě odpovídající druhy (plodnice/mykorhizní špička).

Závěr

Morfologický popis a molekulární analýza ektomykorhizních hub poskytují ne zcela slučitelné, ale nicméně se doplňující se výsledky. Určitá taxonomická jednotka může vytvářet různé morfologické typy, a odlišné taxony mohou vytvářet vzájemně si podobné morfotypy. Tyto výsledky naznačují, že existuje morfologické „překrývání“ a že pro ektomykorhizní taxony je nutné hodnotit velký počet morfologických znaků, tj. popis založený pouze na morfologii není dostačující (WURZBURGER a kol. 2001). Výsledky PCR-RFLP analýzy ITS regionu ukazují, že některé mykorhizní špičky obsahují více než jeden mykorhizní houbový organismus. Přesná identifikace dané mykorhizní houby je možná na základě sekvenační analýzy. Molekulární přístup se pak jeví vhodnou alternativou morfologické identifikace mykorhizních hub.

Studie byla provedena za podpory projektu MSM6007665806.

Literatura

- ALLEN M.F. 1992: Mycorrhizal Functioning. Chapman and Hall, New York London.
- BIANCOTTO V. & BONFANTE P. 1998: Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi. In: VARMA A. & HOCK B. (eds.): Mycorrhiza 2nd edn. Springer Verlag, Berlin.
- BONFANTE P. & PEROTTO S. 1995: Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytologist (Tansley Review, N. 82), 130: 3–21.
- BRUNS T.D. 1995: Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil, 170: 63–73.
- BRUNS T.D. & GARDES M. 1993: Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. Molecular Ecology, 2: 233–242.
- DAHLBERG A. & STENLID J. 1995: Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations. Canadian Journal of Botany, 73: S1222–S1230.
- GARDES M. & BRUNS T.D. 1996: ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: CLAPP, J.P. (ed.): Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods, Methods in molecular biology, Vol. 50 – Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 177–186.
- GARDES M., WHITE T.J., FORTIN J.A., BRUNS T.D. & TAYLOR J.W. 1991: Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany, 69: 180–190.
- GIANINAZZI S. & SCHUEPP H. 1994: Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhauser Verlag, Basel.
- HARRINGTON T.C., McNEW D.L., STEIMEL J., HOFSTRA D. & FARRELL R. 2001: Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. – Mycologia, 93: 111–136.
- HARRINGTON T. C. & McNEW D. 2003: Phylogenetic analysis places the *Phialophora*-like anamorph genus *Cadophora* in the *Helotiales*. – Mycotaxon, 87: 141–151.
- HARRISON M. 1997: Vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis, an underground symbiosis. Trends in Plant Science, 2: 54–60.
- HORTON T.R. 2002: Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. – Plant and Soil, 244: 29–39.
- HORTON T.R. & BRUNS T.D. 2001: The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Molecular Ecology, 10: 1855–1871.
- KÄRÉN O., HÖGBERG A., DAHLBERG A., JONSON L., NYLUND J.-E. 1997: Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by andonuclease analysis. New Phytologist, 136: 313–325.
- KÄRÉN O. & NYLUND J.E. 1997: Effects of ammonium sulphate on the community structure and biomass of ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce stand in southwestern Sweden. Can. J. Bot., 75: 1628–1642.
- KREUZINGER N., PODEU R., GRUBER F., GOBL F. & KUBICEK C.P. (1996): Identification of some ectomycorrhizal basidiomycetes by PCR amplification of their GDP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) genes. Applied and Environmental Microbiology, 62: 3432–3438.
- LANFRANCO L., PEROTTO S. & BONFANTE P. 1998: Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. In: BRIDGE P.D., ARORA D.K., REDDY C.A. & LANDER, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, pp. 107–124.
- LIU Y., ROGERS S.O. & AMMIRATI J.F. 1997: Phylogenetic relationships in *Dermocybe* and related *Cortinarius* species taxa based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. Can. J. Bot., 75: 519–532.
- MARTIN F., LAURENT P., DE CARVALHO D., BURGESS T., MURPHY P., NEHLS U. & TAGU D. 1995: Fungal gene expression during ectomycorrhiza formation. Canadian Journal of Botany, 73: S541–S547.
- METHVYN A., HUGHES K.W. & PETERSEN R.H. 2000: *Flammulina* RFLP patterns identify species and show biogeographical patterns within species. Mycologia, 92: 1064–1070.
- MOLINA F.I., JONG S. & HUFFMAN J.L. 1993: PCR amplification of the 3 external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. FEMS Microbiology Letters, 108: 259–264.
- PEINTNER U., BOUGHER N.L., CASTELLANO M.A., MONCALVO J.-M., MOSER M.M., TRAPPE J.M. & VILGALYS R. 2001: Multiple origins of sequestrate fungi related to *Cortinarius* (*Cortinariaceae*). American Journal of Botany, 88: 2168–2179.
- ROSLING A., LANDEWEERT R., LINDAHL B.D., LARSSON K.-H., KUYPER T.W., TAYLOR A.F.S. & FINLAY R.D. 2003: Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. New Phytologist, 159: 775–783.
- SMITH S. E. & READ D.J. 1997: Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.

- SPREADBURY C.L., BAINBRIDGE B.W. & COHEN J. 1990: Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacers region from the ribosomal RNA genes complex of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 136: 1991-1994.
- SWOFFORD D.L. 2002: PAUP 4.10b: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- WURZBURGER N., BIDARTONDO M.I. & BLEDSOE C.S. 2001: Characterization of *Pinus* ectomycorrhizas from mixed conifer and pygmy forests using morphotyping and molecular methods. *Can. J. Bot.*, 79: 1211-1216.

Kontakt

Vladislav Čurn¹, Barbora Kubátová¹, Miloslava Kavková², Vendula Endrychová¹
¹JU v Českých Budějovicích, Biotechnologické centrum, Zemědělská fakulta, Studentská 13,
e-mail: vcurn@seznam.cz
²JU v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Branišovská 31

POZNATKY Z TESTOVANIA

mykorizovaného preparátu Vambac na smreku

(*Picea abies* L.) v oblasti s dlhodobým zvýšeným stavom

***Armillaria* sp.**

Anna Tučeková, Valéria Longauerová, Roman Leontovyč
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen

Úvod a problematika

V posledných desaťročiach sú aj lesy Slovenska vystavené dlhodobému pôsobeniu komplexu škodlivých antropogénnych činiteľov, najmä imisiám. V tomto smere patria regióny Kysúc a Oravy medzi štyri najviac ohrozené regióny na Slovensku. Smrek je dominantnou drevinou pokrývajúcou polovicu rozlohy lesov v tejto oblasti. V posledných rokoch sú smrekové porasty na Kysuciach vážne poškodené v dôsledku napadnutia podkôrným hmyzom (*Ips typographus* a *Pityogenes chalcographus*) a hubovými chorobami (*Armillaria* sp.), ktoré spôsobili úhyn veľkého počtu stromov, straty na produkcii dreva a zhoršenie stavu životného prostredia. Väčšina lesov napadnutých podkôrným hmyzom a hubou *Armillaria* sú smrekové monokultúry alebo zmiešané porasty, s podielom smreka viac ako 75%. Napriek vzrastajúcej tendencii uplatňovania prírode blízkyh zásad pestovania lesa má aj umelá obnova lesa stále výrazný podiel. Treba na ňu vypestovať čo najkvalitnejší sadbový materiál, s kvalitným koreňovým systémom, s prítomnými mykorízami, ktoré môžu byť jedným z ekologických prostriedkov na zvýšenie ujatosti a odrastania lesných kultúr (REPÁČ 2007).

U viac ako 80% všetkých rastlinných druhov na planéte je mykorízna symbióza prirodzene vytvorená (MEJSTRÍK 1988). Z literatúry je známe aký má význam pre rastlinu mykoríza. Mykoríza je prirodzenou symbiózou medzi koreňom a pôdnymi hýfami húb, predstavuje ich vzájomné prospešné spolunažívanie. Huby a rastliny zúčastňujúce sa tejto symbiózy sa označujú ako mykorízne a novovytvorené spoločné orgány koreňov a húb sa nazývajú mykorízy. Mykorízne symbiózy sa vyskytujú asi u 90% všetkých rastlinných druhov. Rôzne formy mykoríz sú vlastne akýmsi prídavným orgánom rastlín, ktorý zlepšuje ich výživu.

Gáper uvádza prednosti mykoríz:

- využívajú väčší objem pôdy a zároveň majú zväčšený povrch pre príjem minerálnych látok
- majú zvýšený príjem niektorých mikroelementov i pri veľmi nízkych koncentráciách
- majú zvýšenú rezistenciu voči napadnutiu koreňov hubovými patogénmi
- majú zvýšenú toleranciu k stresovým vplyvom sucha, nízkych teplôt, ku kolísaniu pH a sú odolnejšie voči pôsobeniu toxínov.

Mykorizácia koreňov teda vedie k lepšej schopnosti sadeníc prijímať z pôdy živiny, ktoré sú nedostupné pre nemykorízne korene. Hubový plášť na povrchu koreňov slúži na akumuláciu prijatých živín. Rýchlejšie a na dlhšie absorbuje a akumuluje pre rastlinu dôležité látky ako dusík, fosfor, draslík a vápnik, pričom ich dokáže uskladňovať a v čase nedostatku uvoľňovať príp. poskytovať rastline. Celé podhubie preniká pôdnym prostredím ďaleko od mykorízy. Tieto skutočnosti sú dôležité z ekologického aj ochranného hľadiska v lesoch s mimoprodukčnými funkciami, v lesoch ochranných a osobitného určenia ale hlavne v lesoch poškodených imisiami. Takouto oblasťou sú aj lesy na Kysuciach (TUČEKOVÁ A KOL. 2007).

Veľkovýrobné technológie pestovania sadbového materiálu a narušené mykorízne pomery na výsadbových plochách sťažujú prirodzenú tvorbu mykoríz (REPÁČ 2001). CUDLÍN A KOL. (1990) uvád-

zajú, že jednou z príčin neúspechu zalesňovania vegetatívnym materiálom môže byť nedostačujúci vývin mykoríz.

Po niekoľkoročných pozorovaniach a spracovaniach pedologických analýz v lokalite Kysúc – OZ Čadca - na kalamitných holinách po rozpade monokultúr smreka naďalej pretrváva nevyváženosť živín. Na týchto holinách je nielen kyslé až veľmi kyslé pôdne prostredie ale aj s ním súvisiace mikrobiologické zmeny s nepriaznivým stavom pôdneho mikrobiálneho života. Potvrdilo sa nám, že pri nízkej hodnote pH (od 3,8-4,2) nastupuje absencia pôdnych mikroorganizmov (napr. bežných baktérií ako je aj *Azotobacter*) a pretrváva silný atak húb rodu *Armillaria* sp, *Heterobasidion* sp., ktoré napádajú už v juvenilných štádiách novozakladané kultúry.

Z tohto dôvodu je na kalamitných holinách po rozpade smrekových monokultúr opodstatnené nielen prihnojovanie ale aj meliorácie umelo zakladaných porastov s úpravou pôdneho prostredia (TUČEKOVÁ 2004, TUČEKOVÁ 2006, TUČEKOVÁ A KOL. 2005, 2006, TUČEKOVÁ, LONGAUEROVÁ 2008). Jednou z možností ako využiť väčší objem pôdy a zároveň zväčšiť povrch koreňového systému pre príjem minerálnych látok je aplikácia mykorízneho inokula pri umelej výsadbe. Aj keď tento spôsob vnášania inokula do pôdy je najzložitejším a zároveň aj najdrahším opatrením.

Cieľom nášho výskumu bolo overiť na požiadanie ŠL SR v Banskej Bystrici dostupný mykorizovaný biopreparát VAMBAC v podmienkach veľkoplošných kalamitných holín Kysúc hlavne na drevine smrek.

Výzvu k opatrnosti používať tento preparát publikoval v Lese 5-6/2001 Ing. I. Repáč, CSc., ktorý sa problematike mykoríz na Slovensku podrobnejšie venuje.

Vzhľadom na to, že testovanie akéhokoľvek biopreparátu je veľmi obtiažne a nákladné a vzhľadom na nejasnosti ohľadne účinnosti zložiek spomínaného biopreparátu VAMBAC spracovala v minulosti na objednávku pre Lesy ČR Hradec Králové p. Ing. E. Chmelíková posudok (CHMELÍKOVÁ, 2000). Informácie pre posudok čerpala z verejne prístupných zdrojov a hodnotení, vrátane vlastných experimentov. Výrobcom doporučovaný spôsob aplikácie preparátu na korene sadeníc bol pre ektomykorízne inokulum veľmi netradičný a nezaručoval úspešný vznik symbiózy s takto dodaným hubovým druhom (vzhľadom k nemožnosti vypestovať v škôlke semenáčik bez mykoríznej infekcie). Autorka ďalej uvádzala, že pri testovaní rozdielov medzi mykorizovanými a nemyorizovanými (ošetrenými preparátom Agricol) sadenicami buka sa neukázali očakávané zmeny. Preparát nemal vplyv na ujímavosť sadeníc (dokonca použitý preparát na sadenicách buka lesného na VS VÚLHM Opočno vykazoval negatívny vplyv na ujatnosť sadeníc) a medzi jednotlivými variantami sa nezaznamenali výrazné rozdiely v stupni mykoríznej infekcie. Aj nám sa po aplikovaní biopreparátu v imisnej magnezitovej oblasti Jelšavy na drevinách dub a buk ukazovali v minulosti podobné výsledky (TUČEKOVÁ 2001).

Metodika

V oblasti Kysúc sme po veľkoplošnom rozpade smrekových monokultúr overovali v umelo obnovených porastoch viacero hnojivých preparátov (tabletové lesnícke pomaly rozpustné hnojivo SILVAMIX®MG, organominerálne hnojivo Rokosan, Rokohold, prírodné hnojivo Conavit, organické hnojivo Veget, mikrobiologický pôdny kondicionér BactoFil B v kombinácii s hydrogelmi radu STOCKOSORB® (Powder, Micro). V posledných dvoch rokoch sme overovali na požiadanie štátnych lesov aj mykorizovaný preparát VAMBAC. Všetky spomínané hnojivá a preparáty sme overovali v 6-tich porastoch, v prevádzkových výsadbách 5. lesného vegetačného stupňa, v prechodnom rade z kyslého do živného (A/B), na drevinách smrek, smrekovec, jedľa, buk a javor. Najväčšiu pozornosť v rámci výskumu sme venovali drevine smrek, ktorá v týchto

Tab. 1: Základné charakteristiky výskumnej plochy na LS Oščadnica

Pokusná plocha	Číslo por.	Zalesnené v roku	Drevina	Lesný typ (%)	Expozícia	Sklon (%)	Nadm. výška	Poznámka
Oščadnica	150	2007	Smrek	5206 100%	V	20	850	jamková výsadba: mykorizovaný preparát VAMBAC

podmienkach výrazne ustupuje. Základná charakteristika vybraných porastov, v ktorých sme vyhodnocovali výsledky aplikácie mykorizovaného prípravku VAMBAC na drevine smrek v kalamitnej oblasti PP Oščadnica je v **tabuľke 1**.

Na konci vegetačného obdobia sme uskutočnili na umelo vysadenom ošetrovanom sadbovom materiále smreka meranie rastových parametrov, vrátane podrobného hodnotenia architektiky koreňového systému. Kontinuálne sme vyhodnocovali vplyv mykorizovaného preparátu na ujatosť, straty a následný celkový adaptačný proces vysadených drevín. Rozdiely v rastových parametroch sme štatisticky otestovali (analýza variancie).

V laboratórnych podmienkach na semenáčikoch smreka sme simulovali druhý pokus s overovaním: - 6-tich mykorizovaných inokúl (izolátov - *Coenococum*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Paxillus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*)

- VAMBAC- Mix (6 izolátov spolu)
- 2 kontrolných variantov

Pokus s aplikáciou mykorizovaných izolátov sme založili toho istého roku v máji (2007), v skleníku na Národnom lešníckom centre vo Zvolene. Jednoročné semenáčiky smreka sme po ošetrovaní koreňového systému mykorizovanými izolátmi vysadili do minerálnej zeminy prinesenej z PP Oščadnica, do rašelino-celulózoých korenáčov – Jiffy Pots. Jednotlivé varianty smrekových obalených sadeníc sme zavlažovali bežne používanými postupmi pri pestovaní krytokorenného sadbového materiálu. Po vegetačnom období (október 2007) sme vyhodnotili nadzemnú časť aj koreňový systém všetkých ošetrovaných sadeníc. Koreňový systém sme spracovali metodikou WinRhizo, s podrobným zhodnotením jemných koreňov, koreňových špičiek a sušiny. Analýza koreňov sa uskutočnila programom WinRHIZO® Régent Instruments Inc., ktorý funguje na princípe vyhodnocovania snímok koreňov získaných skenovaním. Vzorok koreňov sa skenovali na skeneri EPSON Expression 1000XL.

Výstupy analýz sú parametre jemných koreňov:

- počet koreňových zakončení - dĺžka koreňov (cm),
- povrchová plocha (cm²),
- projekčná plocha (cm²),
- objem koreňov (cm³) a iné

Výsledky a diskusia

Vyhodnotenie aplikácie mykorizného preparátu VAMBAC aplikovaného na výsadbách smreka v oblasti Kysúc

Na základe pozorovaní pri analýze koreňového systému jednotlivých ošetrovaných variant smreka vysadeného na kalamitnej holine Kysúc môžeme konštatovať, že vplyv aplikovaných inokúl (zmes izolátov) na rozvoj jemných vlásočnicových koreňov je po aplikácii Vambac-u znateľný. Kontrolné varianty preukazujú slabšie prekorenenie kostrovými, ale najmä vlásočnicovými koreňmi v celom koreňovom priestore. Jemné korene a hlavne ich zakončenia sú fyziologicky najaktívnejšou časťou koreňových systémov. Zabezpečujú príjem vody a živín do organizmu drevín. Zároveň sú aj citlivým indikátorom kondície drevín a ich rastových podmienok. Habitus nadzemnej časti potvrdzuje lepší zdravotný stav výsadiet, vyššie je aj % oihličenia, pričom ich farba je výrazne sýtozelená a novo napučané ihlice sú oproti kontrole dlhšie (približne o 1/4).

Pri sadeniciach smreka ošetrovaných zmesou 6 mykorizovaných izolátov (inokulom) sa potvrdilo vyššie percento aktívnych koreňových špičiek oproti ďalším kontrolným variantom. Na všetkých vyzdvihnutých a hodnotených vzorníkoch sme však pred výsadbou vizuálne pozorovali mykorizné koreňové špičky, ktoré zrejme boli na sadeniciach prirodzené prinesené už zo škôlky. Pri pestovaní borovice aj REPÁČ (2007) uvádza, že koreňky semenáčikov boli rozsiahlo kolonizované propagulami prirodzene sa vyskytujúcich symbiotických húb. Sadenice, ktoré majú pred výsadbou

na koreňoch so sebou prinesené symbiotické mykorízne huby, by mali preukázať pozitívny vplyv na šok z presadenia, celkové ujetie a odrastanie výsadiet. Percento strát vo všetkých variantoch smreka od 12-30% túto skutočnosť nepotvrdilo. Na plochách s kontrolovanou výsadbou sme náhodným výberom odobrali na konci vegetačnej sezóny po 10 sadeníc všetkých vysádzaných smrekov v obidvoch variantoch. Zo všetkých vzoriek boli odobraté časti z koreňov, koreňového krčka na kultiváciu. U 1/10 kontrolovaných vzoriek všetkých drevín sme zistili na koreňoch prítomnosť rhyzomorf václavky. Rizomorfy sú typ trvalého podhubia, ktoré morfológicky pripomína korene rastlín. Sú tvorené stmelеныmi vláknami podhubia na povrchu s čiernou kôrou. Pomocou nich sa václavka šíri popod hrabanku v pôde a napáda korene hostiteľa. Tieto napadnutia sa častejšie vyskytovali na deformovaných poškodených koreňoch (v ohyboch).

Pri kultivácii na sladínovom agare bola ďalej zistená na koreňoch aj koreňových krčkoch prítomnosť húb *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.*, a *Verticillium sp.*

Rozsah a intenzita pôsobenia symbiotického mykorízneho vzťahu závisí od podmienok prostredia a druhu huby aj samotnej dreviny. Všetky výsadby okrem kontrolného variantu boli vysadené s aplikáciou hydrogelov na koreňovom systéme. Táto skutočnosť taktiež významne neovplyvnila vyššie percento ujetosti jednotlivých ošetrených a neošetrených výsadiet.

Po 1. aj 2. roku malo aplikované mykorízne inokulum len slabý vplyv na rastové parametre nadzemnej časti smreka (štatisticky významné rozdiely vid' tabuľka). Významnejší efekt mal prípravok ako bolo uvedené na rozvoj jemného vlásoknicového koreňového systému. Jemné koreňky posledného rádu a hlavne ich zakončenia sú fyziologicky najaktívnejšou časťou koreňových systémov. Zabezpečujú príjem vody a živín do organizmu drevín. Zároveň sú aj citlivým indikátorom kondície drevín a ich rastových podmienok.

Vyhodnotenie vzorníkov krytokorenných sadeníc smreka s aplikáciou mykorizovaného preparátu Vambac programom WinRHIZO

Simulovaný pokus aplikácie Vambac-u v kontrolovaných laboratórnych podmienkach, ktorý sa uskutočnil v období máj - október 2007 sme vyhodnocovali na 100ks krytokorenných sadeníc smreka. Po aplikácii 6 spomínaných druhov jednotlivých izolátov mykorizovaného preparátu Vambac, sme detailne vyhodnotili nadzemnú časť ale najmä koreňový systém, jeho rozvoj, sušinu a celkovú architektóniku (WinRHIZO Profesional - podiel jemných koreňov, celková dĺžka koreňov, deformácie koreňového systému). V **tab. 2** uvádzame biometrické parametre nadzemnej časti smrekov po 6 mesiacoch po aplikácii všetkých prípravkov. Medzi variantmi boli nevýznamné rozdiely v rastových parametroch.

Z praktického hľadiska je dôležité hodnotenie rozsahu mykoríznej symbiózy celej koreňovej sústavy semenáčikov a sadeníc. Toto hodnotenie sme uskutočnili na ošetrených krytokorenných sadeniciach smreka po 6. mesiacoch. Ako možno vidieť na fotodokumentáčnom materiále väčšie rozdiely pozorujeme medzi variantami s aplikáciou jednotlivých izolátov a kontrolou. Kombinácia všetkých 6-tich izolátov nepreukazuje zvýšené počty jemných koreňových zakončení - fyziologicky najdôležitejšie koreňky posledného rádu (pozri **tab. 3, obr.1**). Najvyšší počet zakončení má variant Rhizopogon a za ním nasleduje Coenococum. Najmenej koreňových zakončení (mykoríznych špičiek) má variant Laccaria a potom nasleduje Kontrola. Aj MORTIER A KOL (1988) uvádzali, že aj najvyššia dávka inokula huby *Laccaria laccata* nestimulovala tvorbu mykoríz. Dĺžka koreňov, povrchová plocha a objem súvisia s hmotnosťou sušiny. Najnižšiu hmotnosť má opäť

Tab. 2: Ujetosť, prežívanie a biometrické vyhodnotenie (so štatistickou významnosťou zistených rozdielov) smrekových výsadiet s aplikáciou biopreparátu VAMBAC na PP Oščadnica po 1.a 2. roku

Drevina variant	Variant	Výška jar	Výška po 1.r.	Výška po 2.r.	Hrúbka jar	Hrúbka po 1.r.	Hrúbka po 2.r.	Ujetosť (prežívanie)	
		cm			mm			po 1. r.	po 2. r.
smrek	Vambac	33,9 ^a	36,7 ^a	48,1 ^a	5,3 ^a	7,0 ^a	10,3 ^a	72	72
I. opakovanie	Kontrola	35,3 ^a	37,2 ^a	44,8 ^b	4,7 ^a	5,6 ^b	9,9 ^b	72	70
smrek	Vambac	35,9 ^a	45,0 ^a	43,3 ^a	4,7 ^a	5,2 ^a	8,6 ^a	88	77
II.opakovanie	Kontrola	34,9 ^a	33,9 ^b	43,5 ^a	4,6 ^a	5,8 ^a	8,8 ^a	86	82

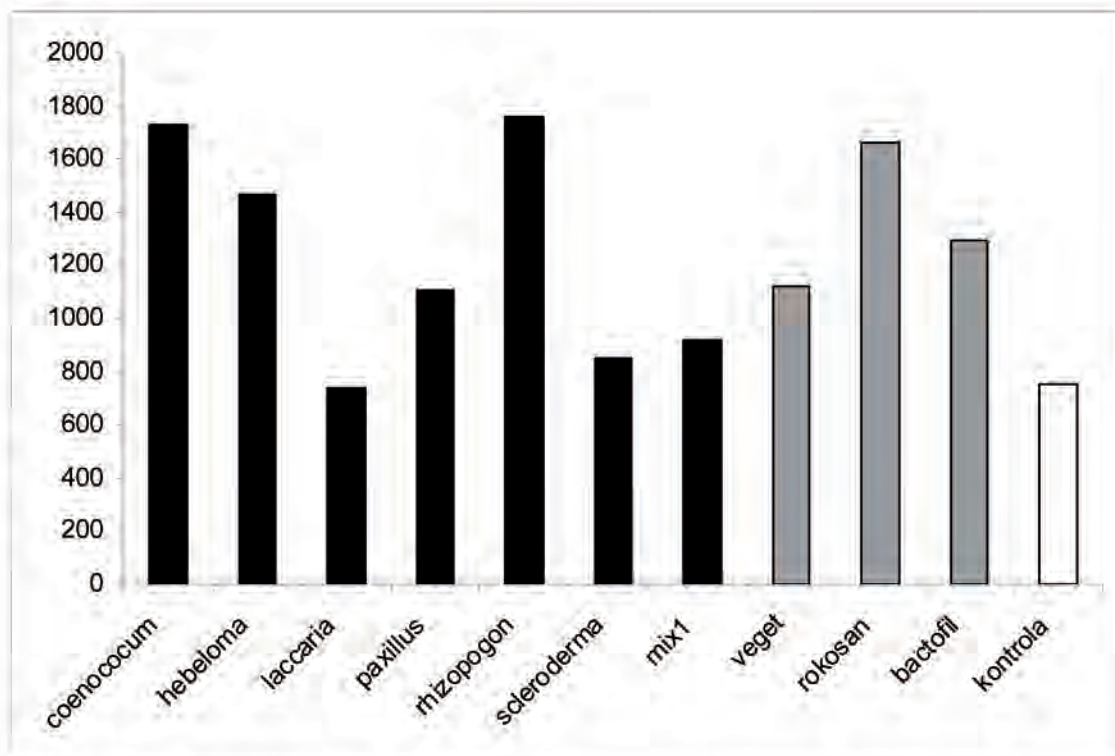
rozdielne písmená znamenajú štatisticky významné rozdiely na $p < 0,05$, ($n=50$)

Tab. 3: Rastové parametre krytokoreenných smrekov 6. mesiac po aplikácii biopreparátu VAMBAC

Variant	Výška po 6. mesiacoch	Výškový prírastok	Hrúbka po 6. mesiacoch
	cm		mm
Coenococum1	9,0	3,6	2,2
Hebeloma 1	10,4	2,5	2,5
Laccaria 1	8,2	2,5	1,9
Paxillus 1	8,1	3,3	1,8
Rhizopogon1	8,7	4,1	1,9
Scleroderma1	8,8	3,8	2,0
Vambac-Mix 1	10,0	3,6	2,1
Kontrola 1	7,8	2,3	1,7
Kontrola 2	7,6	2,2	1,4

Tab. 4: Vyhodnotenie koreňov krytokoreenného smreka s aplikáciou mykorizovaného prípravku VAMBAC programom WinRHIZO

RHIZO 2005b	Dĺžka koreňov	Projekčná plocha	Povrchová plocha	Objem koreňa	Počet zakončení	Dĺžka 0 - 2	Dĺžka 2 <	Plocha 0 - 2	Plocha 2 <	Objem 0 - 2	Objem 2 <	Sušina
	cm	cm ²	cm ²	cm ³	ks	cm	cm	cm ²	cm ²	cm ³	cm ³	g
Coenococum1	611,497	25,8983	81,36	0,861	1733	609,1	2,135	69,06	1,995	0,987	0,158	0,431
Hebeloma 1	755,728	27,6026	86,71	0,792	1467	752,3	3,268	72,15	2,741	0,866	0,191	0,464
Laccaria 1	418,244	15,9149	49,99	0,476	739	417,3	0,859	42,59	0,651	0,521	0,040	0,254
Paxillus 1	478,699	19,3888	60,91	0,617	1106	475,8	2,257	50,47	1,962	0,695	0,143	0,359
Rhizopogon1	691,729	25,4798	80,04	0,737	1759	690,0	1,435	66,92	1,376	0,787	0,114	0,352
Scleroderma1	549,712	22,2842	70,00	0,709	846	547,9	1,668	59,66	1,305	0,769	0,082	0,345
Vambac-Mix	559,894	18,8393	59,18	0,498	920	558,7	0,879	50,54	0,599	0,558	0,032	0,268
Kontrola 1	283,320	11,2314	35,28	0,350	755	282,9	0,405	30,10	0,321	0,370	0,020	0,147



Obr. 1: Počet mykoríznych špičiek (zakončení) na koreňovom systéme smreka 6 mesiacov po ošetrení

Kontrola a najvyššiu Coenococum s Hebelomou. Preukazuje sa teda pozitívny vplyv aplikácie niektorých izolantov jednotlivo. Pretože aplikácia Vambac-u je vlastne kombinácia 6 izolantov (označené – Vambac-Mix) nemožno po hodnotení 1. vegetačného obdobia preukázať významne lepší vplyv mykorizovaných symbiotických húb spolu.

Výsledky analytického vyhodnotenia koreňového systému vzorníkov smreka ošetrovaného mykorizovanými izolátmi a Vambac-Mix sú v **tab. 4** a na **obr. 1**.

Záver

Prvý krát overovaný mykorizovaný preparát Vambac na drevine smrek preukazuje slabý pozitívny efekt na výšku a hrúbku v koreňovom krčku len v jednom opakovaní. Priaznivo sa po 1. vegetačnom období od ošetrovania smreka mykorizovanými hubami vyvíja jemný vlásočnicový koreňový systém. Aktívne koreňové špičky sú však na výsadbách smreka aj po aplikácii iných hnojív a kontrole (pravdepodobne boli sadenice s mykorizou donesené už zo škôlky).

Jednotlivé varianty inokúl v laboratórnom prostredí preukazujú pozitívny vplyv aplikácie niektorých izolantov samostatne (najlepší Rhizopogon a za ním nasleduje Coenococum). Aplikácia VAMBAC-u je producentom doporučovaná ako kombinácia všetkých 6 izolantov (Vambac-Mix). Táto sa po vyhodnotení (6 mesiacov po aplikácii) nepreukázala významne lepším efektom na nadzemnú časť ani na koreňový systém (na fyziologicky najdôležitejšie koreňky posledného rádu) krytokorenných smrekov pestovaných v laboratórnych podmienkach.

Prvé čiastkové výsledky, krátkodobého sledovania (6 - 16 mesiacov) vplyvu mykorizného inokula, nie sú dostatočne výpovedné na zovšeobecnenie a navrhnutie vážnejších záverov o využívaní produktu v lesníckych technológiách.

Tento príspevok vznikol vďaka poznatkom získaných v rámci riešenia vedeckovýskumných projektov „Rekonštrukcia nepôvodných lesných spoločenstiev ohrozených zmenou prírodných podmienok (najmä klímy) na ekologicky stabilnejšie ekosystémy“, „Výskum efektívneho využívania environmentálneho, ekonomického a sociálneho potenciálu lesov na Slovensku “ a s finančnou podporou Agentúry na podporu výskumu a vývoja projektu APVV-0628-07 „Progresívne postupy pestovania sadbového materiálu a umelej obnovy lesných porastov po kalamitách veľkého rozsahu“.

Literatúra

- CUDLÍN, P., CHMELÍKOVÁ, E., MEJSTRÍK, V., 1990: Occurrence of ectomycorrhizal structures in rooted Norway spruce cuttings. In Mycorrhizas in ecosystems – structure and function. Third European symposium on mycorrhizas, Sheffield, 19.-23. August 1991.
- CHMELÍKOVÁ, E., 2000: VAMBAC – přírodní řešení přírodních podmínek? Posudek pro LČR Hradec Králové. Ústav ekologie krajiny AV ČR, České Budějovice:13+prílohy.
- MEJSTRÍK, V., 1988: Mykorrhizní symbiózy. Akademia, Praha: 150.
- MORTIER, F., LE TACON, F., GARBAVE, J., 1988: Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. Ann. Sci. For., 45: 301-310.
- REPÁČ, I., 2001: Tvorba mykoríz a rast semenáčikov borovice lesnej (*Pinus sylvestris* L.) inokulovaných symbiotickými hubami. Acta Facultatis Forestalis, Zvolen: 275-285
- REPÁČ, I., 2007: Poznatky z aplikácie symbiotických húb pri pestovaní semenáčikov borovice lesnej (*Pinus sylvestris* L.). In Obhospodarovanie lesa v meniacich sa podmienkach prostredia (M. Saniga, P. Jaloviar, S. Kucbel eds.), Zborník pôvodných vedeckých prác, Tu Zvolen: 163-170.
- TUČEKOVÁ, A., 2001: Doriešenie umelej obnovy ťažko-zalesniteľných plôch v magnezitovej imisnej oblasti Jelšava – Lubeník. Lesnícky výskumný ústav, Zvolen Výskumná štúdia: 59.

- TUČEKOVÁ, A., 2004: Eliminácia vplyvu extrémov počasia pri zalesňovaní použitím vododržných a biotechnologických (hnojivých) preparátov. In Sborník z 5. česko-slovenského Vedeckého sympozia pedagogických a vedeckovýzkumných pracovísk odboru Pěstování lesa: Hlavní úkoly pěstování lesů na počátku 21. století. Křtiny 14.9-16.9.: 101-120.
- TUČEKOVÁ, A., HALÁK, A., 2005: Výskum účinnosti vododržných materiálov a pôdneho kondicionéra BactoFil® B v umelej obnove imisných holín OZ Čadca. Výskumná správa, LVÚ Zvolen: 22.
- TUČEKOVÁ, A., 2006: Analýza adaptačného procesu a zdravotného stavu novozakladaných porastov na kalamitných holinách Kysúc. Medzinárodná vedecká konferencia „Stabilizace funkcí lesa v biotopech narušených antropogenní činností“. Opočno 5.-6.9.2006: 181-197.
- TUČEKOVÁ, A., LONGAUEROVÁ, V., KUNCA, A., ONDRÁŠEK, Ľ., 2006: Analýza zdravotného stavu mladých porastov na Kysuciach a skúsenosti s ochrannými opatreniami proti patogénom. Aktuálne problémy v ochrane lesa 2006. Zborník referátov z medzinárodného seminára 6.-7. apríla v Banskej Štiavnici. NLC Zvolen: 94-99.
- TUČEKOVÁ, A., LONGAUEROVÁ, V., 2008: Vplyv ekologických a mikrobiologických prípravkov na zdravotný stav a rast drevín v juvenilnom štádiu v oblasti kalamitných holín Kysúc In. Zborník recenzovaných príspevkov z medzinárodnej vedeckej konferencie „Silviculture at the Beginning of 21st Century“ Kostelec nad Černými lesy 9.-10.9.2008, CD, ISBN 978-80-213-1805-2: 14.

Kontakt

Anna Tučeková, Valéria Longauerová, Roman Leontovyč
Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav Zvolen
T. G. Masaryka 22
e-mail: tucekova@nlcsk.org

Poznámky:

Poznámky: