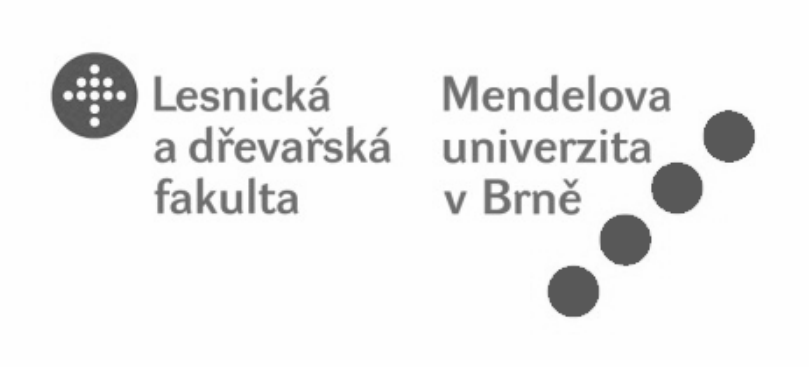
MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Lesnická a dřevařská fakulta

Ústav ochrany lesů a myslivosti



Vliv umělé inokulace na druhové složení ektomykorhizních hub semenáčků borovice lesní

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2014/2015 Karolína Loubalová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv umělé inokulace na druhové složení ektomykorhizních hub semenáčků borovice lesní zpracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b Zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských
závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně, dne: 5.5.2015 ……..

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své konzultantce Mgr. Martině Vašutové, Ph.D. a vedoucímu práce doc. RNDr. Pavlovi Cudlínovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi ochotně poskytovali. Dále děkuji RNDr. Magdě Edwards Ph.D. za zpracování dát pomocí statistického programu Canoco.

Poděkování patří také mé rodině a příteli za podporu a trpělivost během psaní této bakalářské práce.

Tato bakalářská práce byla zpracována s pomocí projektů OPVK MŠMT ČR CZ.1.07/2.3.00/20.0265 Indikátory vitality dřevin a CZ.1.07/2.4.00/31.0214 Platforma pro studium a inventarizaci lesních ekosystémů.

Karolína Loubalová

Vliv umělé inokulace na druhové složení ektomykorhizních hub semenáčků borovice lesní

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá vlivem umělé inokulace na biometrické parametry a výskyt ektomykorhiz na kořenovém systému semenáčků borovice lesní v lesní školce Svinošice.

Rozdíly mezi změřenými biometrickými parametry semenáčků u jednotlivých variant byly testovány analýzou rozptylu (ANOVA). Ektomykorhizy byly tříděny na základě morfologických vlastností do tzv. morfotypů; ektomykorhizní houby, tvořící jednotlivé morfotypy, byly identifikovány srovnáváním sekvencí ITS rDNA. Zjištěná data byla zpracována pomocí statistického programu Canoco.

Inokulace byla neúspěšná, houby, které byly použity při inokulaci nevytvořily na semenáčcích mykorhizy. Zastoupení morfotypů ektomykorhiz na kořenech semenáčků nemělo statisticky významný vliv na jejich biometrické parametry. Pozitivní výsledky této práce spočívají v přehledně popsané a ověřené metodice identifikace ektomykorhizních houbových symbiontů pomocí popisu morfotypů mykorhiz a následné metody srovnávání sekvencí ITS rDNA.

Klíčová slova: ektomykorhiza, inokulace, semenáčky borovice lesní, *Pinus*, *Lactarius*, *Suillus*

Karolína Loubalová

Effects of artificial inoculation on the species composition of ectomycorrhizal fungi of Scots pine seedlings

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the influence of artificial inoculation on biometric parameters and on the occurrence of ectomycorrhiza on the root system of Scots pine seedlings in the forest nursery Svinošice.

Differences between measured biometric parameters of seedlings for each treatment were tested by analysis of variance (ANOVA). Ectomycorrhizas were sorted on the basis of the morphological characteristics into so-called morphotypes; ectomycorrhizal fungi forming individual morphotypes were identified by comparing of sequences of the ITS rDNA. These observed data were processed with statistical program Canoco.

The inoculation was unsuccessful, fungi used for this inoculation did not form mycorrhiza on seedlings. Representation of the ectomycorrhiza morphotypes on the roots of the seedlings had no statistically significant effect on their biometric parameters.

Positive results of this work consist in clearly described and validated methodology for identification of ectomycorrhizal fungal symbionts via the description of mycorrhiza morphotypes and subsequent method of comparison of ITS rDNA sequences.

Keywords: ectomycorrhiza, inoculation, pine seedlings, *Pinus, Lactarius, Suillus*

OBSAH

1. ÚVOD ... 8
2. CÍL PRÁCE ... 9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED ... 10
3.1. Mykorhiza ... 10
3.2. Mykorhizní symbióza ... 10
3.2.1. Typy mykorhizních symbióz ... 11
3.2.2. Význam mykorhizní symbiózy ... 12
3.3. Ektomykorhizní symbióza ... 13
3.3.1 Charakteristika ektomykorhizní symbiózy ... 13
3.3.2. Dřeviny tvořící ektomykorhizní symbiózu ... 14
3.3.3. Houby tvořící ektomykorhizní symbiózu ... 15
3.3.4. Životní cyklus ektomykorhizní houby ... 15
3.3.5. Ektomykorhizní symbióza a půdní prostředí ... 16
3.4. Umělá inokulace ... 17
3.4.1. Přínos inokulace ektomykorhizními houbami ... 19
3.4.2. Vhodné uplatnění pro inokulaci ektomykorhizními houbami ... 19
3.4.3. Vhodné uplatnění pro inokulaci arbuskulárními mykorhizními houbami ... 21
4. METODIKA ... 22
4.1. Charakteristika lesní školky ... 22
4.2. Umělá inokulace sporami hub ... 23
4.3. Charakteristika hub použitých k inokulaci ... 24
4.3.1. Klouzek (hřib) strakoš ... 24
4.3.1.1. Systematické zařazení ... 24
4.3.1.2. Charakteristika ... 24
4.3.1.3. Morfologické znaky mykorhizy ... 25
4.3.2. Klouzek obecný ... 25
4.3.2.1. Systematické zařazení ... 25
4.3.2.2. Charakteristika ... 26
4.3.3. Ryzec pravý ... 26
4.3.3.1. Systematické zařazení ... 26
4.3.3.2. Charakteristika ... 27

4.3.3.3. Morfologické znaky mykorhizy 27
4.4. Biometrické charakteristiky semenáčků borovice lesní 28
4.5. Odběr mykorhiz a dokumentace kořenů 28
4.6. Extrakce DNA, PCR, příprava vzorků na sekvenaci 29
4.6.1. Extrakce genomové DNA 29
4.6.2. Polymerázová řetězová reakce 30
4.6.3. Příprava vzorků na sekvenaci 31
4.7. Identifikace sekvencí 31
4.8. Určování morfotypů 31
4.9. Statistické zpracování dat 32
4.9.1. Porovnávání biometrických parametrů semenáčků programem Statistica 32
4.9.2. Hodnocení výskytu morfotypů na semenáčcích pomocí mnohorozměrné analýzy Canoco 33
5. VÝSLEDKY 34
5.1. Biometrické charakteristiky semenáčků borovice lesní 34
5.1.1. Výška nadzemní části semenáčků 34
5.1.1.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 35
5.1.1.2. Analýza rozptylu (ANOVA) 35
5.1.2. Tloušťka kořenového krčku 35
5.1.2.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 36
5.1.2.2. Analýza rozptylu (ANOVA) 37
5.1.3. Délka hlavního kořene 37
5.1.3.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 38
5.1.3.2. Analýza rozptylu (ANOVA) 38
5.1.4. Sušina nadzemní části 38
5.1.4.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 39
5.1.4.2. Analýza rozptylu (ANOVA) 39
5.1.5. Sušina hlavního kořene 39
5.1.5.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 40
5.1.5.2. Welchova analýza rozptylu 41
5.1.6. Sušina vedlejších kořenů 41
5.1.6.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 42
5.1.6.2. Kruskal-Wallisův test 42

5.1.7. Sušina všech kořenů 42
5.1.7.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA) 43
5.1.7.2. Kruskal-Wallisův test 43
5.2. Druhové složení společenstva ektomykorhizních hub 43
5.2.1. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz z hlediska jejich výskytu na pozici v kořenovém systému 45
5.2.1.1. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz u varianty LK 46
5.2.1.2. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz u varianty LR 47
5.2.1.3. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz u varianty LS 48
5.3. Hodnocení výskytu morfotypů na semenáčcích pomocí mnohorozměrné analýzy Canoco 50
6. DISKUSE 52
7. ZÁVĚR 55
8. SUMMARY 56
9. SEZNAM LITERATURY 57

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem umělé inokulace aplikované na semenáčky borovice lesní v lesní školce Svinošice. Byla mi zadána v druhém ročníku studia a vypracovala jsem ji v laboratořích Centra výzkumu globální xměny AV ČR v Českých Budějovicích a Lesnické a dřevařské fakulty Mendelovy zemedělské a lesnické univerzity. Byla podpořena projekty OPVK MŠMT ČR CZ.1.07/2.3.00/20.0265 Indikátory vitality dřevin a CZ.1.07/2.4.00/31.0214 Platforma pro studium a inventarizaci lesních ekosystémů.

Používání hnojiv a pesticidů v lesních školkách vede k produkci sazenic, které parametry odpovídají příslušným normám, což ale ještě nemusí být zárukou úspěšného ujímání sazenic po výsadbě. Je známo, že vysoké dávky hnojiv omezují rozvoj ektomykorhizních hub na kořenech sazenic a tím schopnost rostlin přežívat na nepříznivém stanovišti v důsledku sníženého příjmu vody a živin kořeny rostlin. Při používání fungicidních pesticidů či desinfekce půdy před výsevem osiva lesních dřevin může být inokulace přínosem pro kolonizaci kořenů ektomykorhizními houbami. Sazenice, jejichž kořeny jsou uměle kolonizovány ektomykorhizními houbami je také vhodné vysazovat mimo přirozený areál rozšíření dřeviny či při zalesňování rekultivovaných ploch.

2. CÍL PRÁCE

Prvním cílem práce bylo zpracování literárního přehledu, týkajícího se mykorhizních hub a jejich praktického využití v arboristice, lesnictví, na plantážích vánočních stromků, rekultivovaných plochách a zalesňovaných půdách.

Druhým cílem bylo změřit vybrané biometrické charakteristiky (výška nadzemní části, délka kořenového systému, tloušťka kořenového krčku, biomasa nadzemní části a kořenů) semenáčků borovice lesní, nenaočkovaných a naočkovaných plodnicemi hub *Suillus variegatus* a *Lactarius deliciosus* + *Suillus luteus*.

Třetím cílem bylo zjistit druhové složení ektomykorhizních hub na kořenovém systému semenáčků. Popsat jednotlivé morfologické typy ektomykorhiz a u jejich zástupců identifikovat mykorhizní symbionty srovnáním sekvencí oblasti ITS DNA.

Čtvrtým cílem bylo statistické vyhodnocení vlivu umělé inokulace na biometrické charakteristiky semenáčků a druhové složení jejich ektomykorhizních hub.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. MYKORHIZA

V roce 1885 byl poprvé použit odborný výraz mykorhiza, pro symbiózu hub a stromů, německým fytopatologem Frankem (Frank 1885). Výraz mykorhiza v doslovném překladu znamená „houbokořen“, jelikož je složen z dvou řeckých slov *mykés*, *mykétas* (houba, hřib) a *rhíza*, *ríza* (kořen).

Termín mykorhiza má dva významy. První význam je používán k označení symbiózy kořenů vyšších rostlin s houbami. Druhý význam slova mykorhiza, je chápán, jako orgán, který vzniká pomocí symbiózy mezi kořenem hostitelské rostliny a mykorhizní houbou (Gryndler et al. 2005; Kolařík et al. 2006). Toto pojetí v posledních desetiletích v odborných kruzích převládá.

3.2. MYKORHIZNÍ SYMBIÓZA

Mykorhizní symbióza je jedním z nejvýznamnějších prospěšných vztahů mezi rostlinami a mikroorganismy (Harley, Smith, 1983). Tento vztah se vyvíjel v průběhu fylogeneze zúčastněných organismů; první mykorhizy byly nalezeny již u paleontologických nálezů z období devonu (Pirozynski, Malloch 1975).

Základem tohoto vztahu je vzájemná výměna živin mezi rostlinou a houbou (Smith, Read 2008). Rostlina je kolonizována houbou jen na některých částech (pletivech) kořene. Mezi tyto části spadá kořenová pokožka *(rhizodermis)* a kořenová kůra, která se nachází přímo pod kořenovou pokožkou. Mykorhizní houba neproniká do kořenového středního válce (Gryndler et al. 2005).

Houba rostlině pomáhá získávat z půdy zejména fosfor, dusík, vodu a zvětšuje absorpční povrch kořenů. Díky zvětšení absorpčního povrchu kořenů, dochází ke zvýšení příjmu látek, které houba rostlině zpřístupňuje. Rostlina houbě poskytuje produkty fotosyntetické asimilace - cukry, vitamíny a další organické látky (Smith, Read 2008).

Mykorhizní symbiózu tvoří téměř 90% vyšších rostlin. Mezi druhy, které netvoří mykorhizní symbiózu patří například rostliny z čeledí: *Chenopodiaceae* (merlíkovité), *Brassicaceae* (brukvovité), *Juncaceae* (sítinovité), *Cyperaceae* (šáchorovité) a

Polygonaceae (rdesnovité) (Harley, Harley 1987). Houby, které žijí v symbióze s vyššími rostlinami náleží především do oddělení hub stopkovýtrusích (*Basidiomycetes*, basidiomycety), vřeckovýtrusích (*Ascomycetes*, ascomycety) a hub spájivých (*Zygomycetes*, zygomycety). Spousta zástupců těchto houbových skupin se v půdě vyskytuje zároveň a vytváří v ní houbová společenstva (Gryndler et al. 2005).

3.2.1. Typy mykorhizních symbióz

Existují tři morfologicky výrazné typy mykorhizní symbiózy, ektomykorhizní, endomykorhizní a ektendomykorhizní. Rozdíly mezi nimy spočívají v houbových hyfách. Na houbové hyfy je pohlíženo z hlediska toho, jestli vytváří na povrchu kořene rostliny houbový plášť a zda pronikají do buněk primární kůry kořene.

Endomykorhizní symbióza je charakteristická tím, že mykorhizní houba proniká do vnitřního i mezibuněčného (interceluláního) prostoru buněk kořene hostitelské rostliny. Endomykorhizní symbióza nevytváří plášť z hyf, ani Hartigovu síť, ale na povrchu kořene může vytvářet řidší či hustší síťku. U endomykorhiz nevznikají morfologické změny ve stavbě kořínků. Na kořenech zpravidla zůstává kořenové vlášení. Na rozdíl od ektomykorhizní symbiózy není endomykorhizní symbióza pouhým prohlédnutím patrná (Mejstřík 1988).

Tento typ mykorhizní symbiózy se dále dělí na tři podtypy (arbuskulární, dříve vesikulo-arbuskulární mykorhizu, erikoidní mykorhizu a orchideoidní mykorhizu). Podtypy jsou rozděleny na základě hostitelských druhů rostlin a houbových symbiontů. Endomykorhizní symbiózu vytváří až 300 000 druhů rostlin, většinou jsou to zemědělské plodiny. Naopak hub žijících v endomykorhizní symbióze je málo, převážně náleží do třídy *Zygomycetes* (Smith, Read 2008).

Ektomykorhizní symbióza je typická tím, že se mykorhizní houba dostává pouze do mezibuněčných intercelulárních buněčných prostor. U ektomykorhiz dochází k morfologickým změnám ve stavbě kořínku. Ektomykorhizy vytvářejí hyfový plášť a Hartigovu síť (Gryndler et al. 2005). Ektomykorhizní symbiózu vytváří přibližně 2000 druhů rostlin. Druhů hub žijících v ektomykorhizní symbióze je kolem 5000, většinou náleží do třídy stopkovýtrusých (*Basidiomycetes*) a vřeckovýtrusých (*Ascomycetes*) (Allen 1992).

Ektendomykorhizní symbióza je specifická tím, že houbové hyfy prorůstají jak dovnitř buněk, tak i do mezibuněčných (intercelulárních) prostorů buněk kořene

hostitelské rostliny. Ektendomykorhiza vytváří plášť z hyf i Hartigovu síť. Lze ji ještě dělit na arbutoidní a monotropoidní mykorhizu (Smith, Read 2008).

Má-li mykorhizní symbióza vzniknout, je třeba, aby půda obsahovala živé mykorhizní houby. Ty mohou být ve formě klidových stádii (spor), nebo jako již symbioticky rostoucí či vegetativní (dočasně přežívající bez hostitele) podhoubí (mycelium). Symbiotické nebo vegetativní mycelium kolonizuje kořen přímo, spory musí nejprve vyklíčit. Mycelium je citlivé k výkyvům vlhkosti, sucho je může zahubit. Spory naopak mohou přečkat nepříznivé podmínky a kolonizovat kořeny po zlepšení stavu prostředí (Gryndler et al. 2005).

Ve své bakalářské práci se zabývám pouze jedním typem mykorhizní symbiózy, a to ektomykorhizním.

3.2.2. Význam mykorhizní symbiózy

Jak již bylo řečeno, rostlina získává prostřednictvím houby vyšší množství minerálních živin, zejména fosforu a dusíku, zvětšuje absorpční plochu kořenů a efektivněji přijímá vodu. Získané minerální látky dovede mykorhizní houba kumulovat a v období nedostatku živin, je uvolňuje a předává rostlině. Mykorhizní houby zásobují kromě toho kořeny rostlin vitamíny, růstovými látkami a různými mechanismy, které chrání kořen hostitelské rostliny (Harley, Smith 1983). K těmto mechanismům patří fyzická bariéra houbového pláště u ektomykorhiz a schopnost houbového symbionta vylučovat v okolí kořene látky antibiotické povahy a ovlivňovat jeho osídlení rhizosferní mikroflórou (Sadílková 2008).

Díky mykorhizní symbióze bylo zjištěno u silně mykorhizních rostlin zlepšení vodního režimu rostliny, vlhkostní výkyvy jsou menší a voda je v rostlině pohyblivější. Mykorhizní rostliny mají vyšší obsah chlorofylu v listech, více transpirují a mají zvýšenou intenzitu fotosyntézy (Tesařová, Stroblová 2006).

Rostliny kolonizované mykorhizními houbami mají také větší odolnost na abiotické environmentální stresy, mezi které patří nízká teplota, sucho, sanilita, nízké hodnoty pH, kontaminace chemikáliemi a zněčištění půdy kovy. Význam má v mykorhizní symbióze i extramatrikální mycelium v půdě okolo kořenů hostitelské rostliny, které zvyšuje agregaci půdy a působí jako protierozní činitel. Kořeny rostlin (stejného i odlišného druhu) mohou být propojeny souborem hyf a živiny mohou být transportovány od jedné

rostliny ke druhé, čímž jsou omezeny konkurenční vztahy a je podpořena uniformita porostu (Smith, Read 2008).

Některé rostliny žijí se specifickými bakteriemi, které mohou získávat živiny i z méně rozpustných zdrojů, které jsou ale pro rostlinu, která nežije v mykorhizní symbióze, nedostupné (Vosátka 2003). Všechny tyto významné faktory, existující díky soužití v mykorhizní symbióze, zajišťují rostlině zvýšenou vitalitu, konkurenční schopnost a odolnost.

3.3. EKTOMYKORHIZNÍ SYMBIÓZA

Ektomykorhizní symbióza patří k nejvýznamnějšímu typu mykorhizní symbiózy. Ať už kvůli její důležité roli v lesních společenstvech od subtropického po boreální pás, tak i proto že je zajímavá pro laickou veřejnost vzhledem k tvorbě jedlých plodnic ektomykorhizních hub (Vohník 2008).

První zmínka o tomto typu mykorhizní symbiózy pochází z roku 1894; v té době ale přetrvávala domněnka, že se jedná o parazitismus, až v roce 1885 zjistil Frank (1885), že se jedná o mykorhizní symbiózu.

3.3.1. Charakteristika ektomykorhozní symbiózy

Ektomykorhizní houby kolonizují krátké postranní kořeny a mladé nesuberizované kořenové špičky. Kolonizací ektomykorhizní houby dochází k rozvětvování postranních kořenů, pravděpodobně vlivem auxinů, které mykorhizní houby produkují (Procházka et al. 1998). Typ větvení postranních kořínků je charakteristický pro vybrané rody dřevin. U dubu a buku jsou rozvětveny monopodiálně, přítomné jsou však i nevětvené formy, zatímco u borovice jsou vidličnatě větvené (Pešková 2008).

Po proniknutí houby dochází k tvorbě tří strukturních komponentů, charakteristických pro ektomykorhizní symbiózy. Na povrchu kořínku se začne vytvářet houbový plášť. Houbový plášť tvoří hyfy, které omezují funkci kořenového vlášení (Procházka et al. 1998). Houbový plášťje tvořen hyfami, které jsou natěsno propletené, vnější vrstvy mívají volnější strukturu (Gryndler et al. 2005). Tloušťka pláště je ovlivněna mnoha faktory, například druhem houbového symbionta a hostitelské dřeviny, délkou vývoje ektomykorhizy a stanovištními podmínkami. Velký význam houbového pláště spočívá ve

fyzické bariéře, která brání před pronikáním patogenních organismů. Do půdního prostředí z povrchu houbového pláště často vyrůstají různé myceliární struktury (extramatrikální mycelium, hyfové provazce a rhizomorfy (Pešková 2008).

Druhým strukturním komponentem je Hartigova síť, která má své jméno po německém biologovi Robertu Hartigovi. Hartigova síť je místem, kde dochází k pronikání houbových hyf do mezibuněčných (intercelulárních) prostor buněk primární kůry. Pronikání hyf může být omezeno buď jen na rhizodermis, což je typické pro krytosemenné dřeviny, nebo mohou hyfy vyplňovat interceluláry několika až všech vrstev primární kůry; tento způsob pronikání hyf je specifický pro nahosemenné dřeviny (Kolařík et al. 2006). Hartigova síť je místem, kde probíhá nejintenzivnější látková výměna mezi houbou a rostlinou. Houba rostlině poskytuje přijaté minerální látky z půdy. Fosfor v podobě aniontů kyseliny fosforečné a dusík převážně v podobě aminokyselin. Rostlina houbě předává jednoduché cukry, které houba přeměňuje na transportní disacharidy (trehalózu) (Smith, Read 2008).

Posledním strukturním komponentem je extramatrikální mycelium. Funkce extramatrikálního mycelia spočívá hlavně v mnohonásobném zvětšení objemu půdy, jelikož houbový plášť nemá velkou kontaktní plochu s půdou. Z půdy houba čerpá živiny a vodu. Extramatrikální mycelium tvoří rhizomorfy, provazce hyf, které mimo toho, že dokáží přijímat živiny z většího objemu půdy, tak pomáhají i k tvorbě nových ektomykorhiz (Agerer 2001).

3.3.2. Dřeviny tvořící ektomykorhizní symbiózu

Ektomykorhizní dřeviny převažují v lesích mírného a boreálního pásma. Někteří autoři proto hovoří o ektomykorhizním lese. V ektomykorhizním lese jsou kořenové systémy jednotlivých dřevin propojeny myceliem symbiotických hub. Tento celek propojených kořenových systému je označován jako ektomykorhizní systém (Lepšová 2003).

Dřeviny tvořící ektomykorhizní symbiózu, pochází především z čeledí *Pinaceae* (borovice, smrk, jedle, modřín), *Fagaceae* (dub, buk), *Betulaceae* a *Corylaceae* (bříza, habr, líska) (Harley, Harley 1987). Tvorba ektomykorhizní symbiózy u dřevin rodu *Eucalyptus*, *Salix* a *Populus* je ovlivněna půdními podmínkami stanoviště. Aby dřeviny z těchto rodů mohly žít v ektomykorhizní symbióze, musí růst na silně humózních půdách (Kolařík et al. 2006).

Existují i dřeviny, které žijí v arbuskulární i ektomykorhizní symbióze. Tyto dřevny pochází např. z čeledi *Aceraceae* (javorovité) (Lepšová 2003). Některé dřeviny pro soužití v ektomykorhizní symbióze vyžadují jen určitého houbového symbionta a naopak (Vosátka 2003).

3.3.3. Houby tvořící ektomykorhizní symbiózu

Ektomykorhizní houby pocházejí pocházejí především z třídy hub stopkovýtrusých a vřeckovýtrusých. Mezi nejznámnější druhy hub, vyskytujících se v naších podmínkách, patří ryzce a holubinky *(Rossulales)*, hřiby *(Boletales)* a muchomůrky (řád *Agaricales*, čeleď *Amanitaceae*), lanýže *(Tuberales)* (Lepšová 2003). Druhy hub žijící v této symbióze jsou vázány buď na jednu nebo více hostitelských dřevin. Bylo zjištěno, že jeden strom může žít v ektomykorhizní symbióze s 15 i více druhy houbových symbiontů (Paulen, Kobolka 2014).

Druh houbového symbionta ovlivňuje jak druh hostitelské dřeviny, tak i její věk. Existují druhy ektomykorhizních hub, upřednostňující dřevinu určitého stáří; následně jsou přirozeně zastoupeny druhy, které preferují dřeviny staršího věku (Mason a kol. 1983).

3.3.4. Životní cyklus ektomykorhizní houby

Životní cyklus ektomykorhizních hub začíná klíčením spor v blízkosti kořene budoucí hostitelské dřeviny. U vřeckovýtrusých hub se tyto spory nazývají askospory, u stopkovýtrusých bazidiospory. Vyklíčením spor vzniká podhoubí (mycelium). Spouštění klíčení spor je ovlivňováno chemickými podněty v blízkosti kořene hostitelské rostliny, exudáty kořene rostliny, odstraněním inhibiční látky v okolí kořenů hostitelské rostliny, nebo zvýšením koncentrací oxidu uhličitého. Ke kolonizaci dochází, když se mycelium dostane do blízkosti povrchu kořene hostitelské rostliny (Gryndler et al. 2004).

Proces kolonizace kořenů mykorhizní houbou je provázen změnami v hormonální rovnováze. Je známo, že ektomykorhizní houby produkují rostlinné hormony auxiny, kyselinu abscisovou a etylen. Před samotnou kolonizací dochází ke komunikaci mezi houbovým symbiontem a hostitelskou rostlinou pomocí chemických látek, zejména auxinu. Kolonizace začíná nahloučením houbových hyf kolem krátkých postranních

kořínků. Na kořínících vzniká houbový plášť. Hyfy pronikající do mezibuněčných prostor vytvářejí Hartigovu síť. Propojením ektomykorhiz s půdním prostředím dochází k tvorbě hyfových svazků, rhizomorf, nebo provazců z rhizomorf (Gryndler et al. 2004).

3.3.5. Ektomykorhizní symbióza a půdní prostředí

Výskyt ektomykorhizní symbiózy na kořenech hostitelských dřevin je ovlivňován mnoha půdními faktory. Mezi tyto faktory patří například půdní horizont, forma nadložního humusu, obsah živin v půdě, (zejména dusíku a fosforu), půdní reakce, acidifikace, vápnění, hnojení, aerace a teplota půdy.

Kořeny žijící v ektomykorhizní symbióze v mírném pasu, rostou nejčastěji v nejsvrchnějších vrstvách půdy s obsahem nadložního humusu (F a H horizont) a minerálním humusovém A horizontu (Mejstřík 1988; Pešková, Soukup 2006); preferovanými formami nadložního humusu je moder, ale mohou růst i ve formách mull a mor (Lepšová 2003).

Vysoké obsahy fosforu a dusíku v půdě zabraňují vzniku ektomykorhizní symbiózy. Důvodem je menší obsah volných cukrů pro mykorhizní houbu v kořenech rostliny s dostatečným přísunem živin. Ektomykorhizni houby proto preferují půdy s nižším obsahem fosforu a dusíku (Gryndler et al. 2004, Mauer et al. 2006). Zvýšený přísun hnojiv s dusíkem též často narušuje mykorhizní symbiózu; (Skeffington, Wilson 1988) zjistili, že zvýšený obsah dusíku v půdě může snížit četnost mykorhizních kořínků v humusové vrstvě až o 50-80%.

Velký význam pro výskyt ektomykorhizních hub má půdní reakce. Bylo zjištěno, že se v kyselých půdách vyskytuje více ektomykorhizních hub, než je tomu u půd vápnitých (Wiemken et al. 2001). Vliv dlouhodobé acidifikace negativně působí na kořenový systém žijící v ektomykorhizní symbióze; dochází k redukci ektomykorhizních kořenů a k jejich poškození.

Vápněním v půdě dochází k urychlení dekompozičních procesů v nadložním humusu a k uvolnění vyššího obsahu živin. Aby tyto uvolněné živiny mohly být dostatečně využity, je potřebný výkonný ektomykorhizní systém. Řada studijí ovšem potvzuje negativní vliv vápnění na mykorhizní symbiózu. Například Kuyper (1991) vysvětluje negativní vliv vápnění na mykorhizní poměry nepřímým vlivem rostoucí dynamiky dusíku, jenž má u většiny ektomykorhizních hub silně inhibiční účinek. Při aplikování hnojiva pouze s vápencem bez obsahu hořčíku dochází spíše k negativnímu ovlivnění

ektomykorhizní symbiózy. Naopak hnojivo s dostatečným obsahem uvolnitelného hořčíku, stimuluje růst a pronikání kořenů do hlubších minerálních horizontů (Pešková 2006).

Oproti tomu urbánní půdy jsou charakteristické vysokou hodnotou půdní reakce, a to díky cizorodým materiálům v půdě, používání vápenatých materiálů v městském historickém stavitelství a zimní údržbě vozovek posypovými solemi, čímž dochází k alkalizaci půd městského prostředí. Alkalizace půdy působí negativně na mykorhizní houbové symbionty, které hrají v městským půdách významnou roli, kvůli primárnímu nedostatku fosforu. Alkalizace půdy ovlivňuje množství živin v půdě, jejich vzájemné poměry a vitalitu mykorhizních houbových symbiontů (Rejšek 2014).

Podle (Kozlowského 1971) sucho také ovlivňuje mykorhizní symbiózu, jelikož vodní defecit omezuje tvorbu nových kořínků, které by mohly být kolonizovány mykorhizní houbou. Je nutné brát však v potaz, že každý druh ektomykorhizní houby se liší svoji citlivostí na dané faktory.

3.4. UMĚLÁ INOKULACE

V případě přirozené inokulace v dobrých mykorhizních podmínkách, mívá již jednoletý semenáček svůj kořenový systém kolonizovaný mykorhizními houbami. Umělá inokulace bývá používána z důvodů špatných mykorhizních podmínek pro přirozenou inokulaci, v případě pomalé přirozené inokulace, nebo je-li zájem o jiného houbového symbionta.

Příprava inokula pro umělou inokulaci má své zásady. Nejprve je nutné vybrat vhodného houbového symbionta. Houbový symbiont je vybírán podle schopnosti převedení a udržení v čisté kultuře, měl by stimulovat růst hostitelské dřeviny, a to i s jejími ranými vývojovými stádii (Mason a kol. 1983) a měl by být odolný vůči stresovým faktorům, vyskytujícím se na cílové lokalitě. Dalšími kritérii jsou reakce na změnu acidity, vlhkosti, teploty, produkce enzymů a vztahy s dalšími organismy, včetně odolnosti vůči patogenním organismům (Pešková 2000). Rovněž musí být posouzena kompatibilita houbového symbionta s ostatními dřevinami, rychlost růstu v kultuře, úspěšnost kolonizace kořenů a bohatost tvorby mykorhiz.

Metod vlastní umělé inokulace je několik: půda, popřípadě hrabanka z porostu dané dřeviny (pro dřeviny v přírodě rostoucí) či hrabanka ze zavedené lesní školky, starší

mykorhizní sazenice, spory hub či vegetativní inokulum houbového mycelia (Cudlín, Chmelíková, 1999). Umělá inokulace pomocí vegetativního inokula zahrnuje izolaci, kultivaci a udržení kultur ektomykrhizních hub in vitro. Vegetativní inokulum arbuskulárních hub musí vždy obsahovat i spory.

Jestliže je vyřešen výběr houbového symbionta a metody umělé inokulace, nastává problém s konkurencí autochtonní mikroflóry a přirozeně se vyskytujících houbových symbiontů v půdě, kde má být provedena umělá inokulace. Tento problém může být vyřešen sterilizací substrátu. Sterilizaci je možno provádět propařováním nebo fumigací Basamidem, popřípadě prolitím fungicidem (Dithane M-45).

Velmi důležitou část v umělé inokulaci hraje doba její aplikace. Vegetativní inokulum, spolu s vodní suspenzí by mělo být aplikováno do půdy nebo substrátu před výsevem, nejpozději však při tvorbě laterálních kořenů, aby se předešlo kolonizaci kořenů ektomykorhizními houbami v půdě. Další, dnes asi nejrozšířenější možností, je namáčení kořenů prostokořenného sadebního materiálu při výsadbě do alginátové suspenze s houbovým inokulem (Chmelíková, Cudlín 2004; Pešková 2000).

Umělá inokulace je ovšem jen prvním krokem úspěšného vytvoření mykorhizní symbiózy. Je třeba dodržovat určité kultivační podmínky po celou dobu růstu semenáčku, nebo sazenic, kterými je podporována tvorba mykorhizní symbiózy. Kultivační podmínky zahrnují přísun dostatečného množství organické hmoty, udržení určité minimální vlhkosti půdy, střední nebo nižší obsah živin a selektivní používání pesticidů. Použití fungicidů by mělo být omezeno jen na sterilizaci půdy, popřípadě na přípravky na bázi benomylu, jelikož vůči němu jsou ektomykorhizní houby relativně odolné, anebo jen na aplikaci na list. Ostatní fungicidní přípravky se doporučují používat nejméně měsíc před umělou inokulací (Fitter, Nichols 1988).

Rozdílná aplikace umělé inokulace musí být prováděna u vzrostlých stromů, ke kterým je inokulum aplikováno pomocí injektáže. Injektáž je prováděna pomocí injektážního aplikátoru, který je zaváděn do půdy v okolí stromu. V hloubce cca 50 cm, dochází díky stlačení vzduchu k provzdušnění půdního profilu, nakypření půdy a k uvolnění cesty inokulu ke kořenům stromu (Symbiom 2014). V současné době se na trhu objevuje široké spektrum přípravků (Symbivit, Rhodovit, Ectovit), které obsahují spóry širšího spektra hub a nosný substrát různé povahy (Paulen, Kobolka 2014).

3.4.1. Přínos inokulace ektomykorhizními houbami

Ektomykorhizní symbióza je zcela nezbytná pro rychlý, zdravý růst a vývoj hospodářsky významných lesních dřevin. Pomáhá stromům překonávat kritické růstové fáze v nepříznivých podmínkách (Harley, Smith 1983).

V postižených oblastech by měly být vysazovány přednostně sazenice s dobře vyvinutým ektomykorhizním kořenovým systémem. Bylo zjištěno, že v prvních dvou letech po výsadbě je jejich přežití výrazně větší (Pešková 2000).

Semenáčky a sazenice stromů s ektomykorhizní symbiózou úspěšně využívají lesníci a školkaři i v zahradnictví. Je však nutno podotknout, že rozdíl mezi mykorhizními a nemykorhiznimi rostlinami nevidíme hned, jelikož houba i rostlina do vzájemného vztahu dává určitou energii, která se můžu ze začátku projevit zpomaleným růstem. Zpomalený růst bývá po měsíci překonán a inokulované rostliny výrazně zvyšují svoji intenzitu růstu. Inokulované semenáčky mají výrazně silnější kmínky, bohatě větvený kořenový systém i nadzemní část (Kavková 2014).

Podstatný vliv hraje skutečnost, odkud pochází zdroj ektomykorhizní symbiózy; zda pochází z lesní školky, nebo jde o vneseného houbového symbionta. Mykorhizní symbióza vzniklá ve školce často po výsadbě odumírá (Trappe 1997), zatímco vhodně vybraní houboví symbionti mohou i po mnoha letech po výsadbě přinášet dobré výsledky (Selosse et al. 2000).

Inokulace ekomykorhizními houbami je nejen využívána za účelem pozitivních vlastností na stav dřevin, ale i pro pěstování jedlých ektomykorhizních hub, ať už hřibovitých nebo lanýžů (Gryndler et al. 2004).

3.4.2. Vhodné uplatnění pro inokulaci ektomykorhizními houbami

Sadební materiál, očkovaný ektomykorhizními houbami, je účelné používat na místech se zhoršenými stanovištními podmínkami pro obnovu lesa, jako je přímé působení imisí na dřeviny, okyselení půdy, nepříznivé podmínky na velkých holinách, dále na půdách s úbytkem mykorhizních hub, způsobeným intenzivním sběrem plodnic, nízkým či vysokým pH, obsahem organické hmoty či antropogenními vlivy. Dále jej lze použít i pro plochy s antropogenním substrátem (výsypky, haldy, odkaliště popílků, skládky), na zalesňovaných zemědělských půdách, které jsou díky používání pesticidů a hnojiv, téměř bez ektomykorhizních hub a na stepích či jiných, původně bezlesích oblastech (Cudlín,

Chmelíková 1999). Jeho použití je významné i při aklimatizaci exotických introdukovaných dřevin či při pěstování dřevin ve sterilizovaném substrátu Inokulované sazenice mají většinou větší ujímavost a jsou odolnější proti nepříznivým podmínkám. Díky myceliární síti, která je vytvořena soužitím houbového symbionta a hostitelské rostliny, dochází ke zpevnění půdy a je zabráněno její erozi (Trappe 1997).

Významná je i inokulace na ochranu starých a památných stromů. Inokulum je k těmto stromům aplikováno pomocí injektáže. Po úspěšné inokulaci dochází k zmlazení a lepšímu růstu. Významnou roli může též sehrát inokulace městské zeleně. Před výsadbou stromů do nádob, nebo stromů zapušťovaných do chodníků by měla proběhnout jejich inokulace při výsadbě, případně později pomocí injektáže. Bylo zjištěno, že inokulovaná městská zeleň vykazuje lepší růst a zpožděný opad listů (Kavková 2014).

Umělá inokulace ektomykorhizními houbami je v zahraničí i hojně využívána při produkci vánočních stromů. Díky inokulaci byla zaznamenána u uměle inokulovaných stromků zvýšená odolnost proti suchu, rychlejší růst, snížení požadavku na hnojení a jejich jehlice byly kvalitnější, co se týká délky, hustoty a barvy (Cordell 1997).

V lesnictví jsou uměle inokulovány sazenice s cílem zvýšit ujímavost po výsadbě a zlepšit jejich růst. Bylo zjištěno, že díky umělé inokulaci kontejnerových sazenic douglasky houbami *Laccaria bicolor* byl po osmi letech od jejich výsadby v lese zvýšen objem dřeva ve srovnání se stromy, jejichž kořenový systém byl osídlen přirozenými ektomykorhozními houbami (Selosse et al. 2000).

Umělá inokulace ektomykorhizními houbami je využívána i pro ozeleňování rekultivovaných ploch, například výsypek a skládek (Schramm 1996). Podle dvou výzkumů provedených ve východním USA, na zdevastovaných suchých půdach po těžbě uhlí s velkými obsahy hliníku, manganu, síry a železa a na plochách, kde v minulosti probíhala těžba kaolínu, bylo zjištěno, že sazenice s vybranými ektomykorhizními houbami měly daleko větší ujímavost a lepší růst a obsahovaly méně těžkých kovů (Walker 1999).

3.4.3. Vhodné uplatnění pro inokulaci arbuskulárními mykorhizními houbami

Inokulum s arbuskulárními houbami bývá používáno u ploch s trávníkem, okrasných keřů, ovocných dřevin, zeleniny, výsadby jednoletých rostlin, balkonových výsadeb, střešních zahrad, bylin a koření, citrusů a pokojových rostlin atd. Trávníkové plochy, které mají být zakládány na jílovitých půdách, či na půdách s neznámou navážkou, mohou být pro lepší růst inokulovány. Pro inokulum se používají houboví symbionti vyskytující se přirozeně v přírodě na trávnících. Inokulum se zapravuje do půdy před vysetím. Naopak u ovocných stromů, okrasných keřů, zeleniny a kvetoucích rostlin jsou používány jiné druhy houbových symbiontů a inokulum je aplikováno přímo ke kořenům rostlin. U inokulovaných ovocných strumů byly zjištěny změny v nadzemní části rostlin. Stromy měly vetší listy tmavší barvy, listy vykazovaly daleko větší obsah chlorofylu, silnější růst letorostů, větší plody, hrubší dřevní a lýkovou část výhonků s bohatšími cévními svazky a s velkou vodivou kapacitou pro vodu a živiny (Paulen, Kobolka 2014).

Dobré zapojení porostu, odolnost proti patogenním organismům a intenzivní násadu květů můžeme pozorovat u výsevu a výsadby jednoletých rostlin. Inokulované balkonové rostliny intenzivněji kvetou a jsou odolnější k suchu. U střešních zahrad je také prokázána daleko větší odolnost vůči suchu. Zeleninové vysadby jsou zdravější a mají vyšší produkci. Plodová zelenina má větší násadu květů, následně plodů a její chuťové vlastnosti jsou daleko intenzivnější. U bylinek a koření byla zjištěna větší tvorba semen a zvýšený obsah účinných látek. Citrusy a pokojové rostliny prokazují lepší růst a bohatší násadu květů (Kavková 2014).

Inokulace arbuskulární mykorhizními houbami má také mnohé výhody pro udržitelnou produkci zemědělských plodin. Její význam je v rostlinné produkci nadále v současně době zkoumán. Byla například objevena užitečnost, arbuskulárních hub pro fytoremediaci kontaminovaných půd. Vykazují též slibný potenciál pro snížení reziduí organofosforečných pesticidů v rostlinných pletivech (Albrechtová et al. 2012).

Nevýhodou arbuskulární mykorhizy je, že spory z těchto hub nejdou uměle kultivovat a lze je množit pouze přímo na rostlinách a a po kultivaci jue získat promýváním půdy (Kavková 2014). Existuje několik přípravků s endomykorhizními houbami, která vyrábí firma Symbiom s. r. o. (Symbiom 2014).

4. METODIKA

4.1. CHARAKTERISTIKA LESNÍ ŠKOLKY

Pokus byl realizován v lesní školce Svinošice, firmy Lesy města Brna, a.s. Lesní školka Svinošice byla založena v 70. letech minulého století Jihomoravskými státními lesy, lesním závodem Kuřim. Její celková podoba byla dobudována v 80. letech minulého století. V roce 2000 přešla pod správu firmy Lesy města Brna, a.s., se sídlem v Kuřimi (Lesy města Brna 2015). Školka leží v nadmořské výšce 450 m n. m. a má celkovou rozlohu 12,66 ha. Produkční plocha má velikost 10,16 ha a obsahuje sedm samostatných ploch spojených podzemním rozvodem závlah.

V lesní školce se pěstují a prodávají semenáčky a sazenice lesních a okrasných dřevin. Jako hlavní dřeviny jsou zde pěstovány smrk ztepilý, borovice lesní, jedle bělokorá, modřín evropský, buk lesní, dub zimní a javor klen. Jako okrajové dřeviny jsou pěstovány jedle obrovská, douglaska tisolistá, smrk pichlavý, smrk omorika, jedle kavkazská, javor mleč, olše lepkavá, lípa srdčitá, lípa velkolistá, třešeň ptačí a dále okrasné dřeviny.

Úhrn srážek se pohybuje v rozmezí cca 350-450 mm/rok. S ohledem na umístění školek (na kopci) jsou srážky v posledních letech na hranici únosnosti. Podle rozdělení půdních druhů dle Nováka, které vychází z velikosti částic v půdě, je v lesní školce hlinito-písčitý půdní druh s dobrou strukturou. V posledních letech dochází vlivem intenzivního hospodaření k úbytku humusové složky kyrtý se doplňuje rašelinovým substrátem a zeleným hnojením (hořčice bílá). Údaje o rozboru půdy z června roku 2013, poskytnuté vedením školky, jsou uvedeny v Tab. 1.

Desinfekce půdy se neprovádí. Mykorhizní inokulum se občas přidává do substrátu na výrobu balené sadby. Plodnice hub se příležitostně objevují na pěstebních substrátech, avšak nebyly určeny. Plodnice druhů hub, které byly použity k inokulaci pro daný pokus, se díky střídání dřevin na záhonech pravděpodobně ve školce nevyskytují. (Ústní sdělení, Z. Hradecký, vedoucí lesní školky Svinošice, 12. ledna 2015

Tab. 1 Rozbor půdy z místa inokulace

ukazatel	jednotka	zjištěná hodnota	nejistota	použitá metoda
pH		5,35	±0,2	SOP 18 (+)
humus	% v sušině	4,08	±10%	titračně
fosfor	mg/kg suš.	63	±10%	SOP 22 (výluh dle Melicha III)
draslík	mg/kg suš.	59	±10%	SOP 23 D (výluh dle Melicha III)
hořčík	mg/kg suš.	91	±10%	SOP 23A (+)
vápník	mg/kg suš.	2240	±10%	SOP 23A (+)

4.2. UMĚLÁ INOKULACE SPORAMI HUB

Na pokus byly vybrány tři záhony, (každý o rozměrech 5x1 m), se semenáčky borovice lesní (*Pinus sylvestris*), které byly vysety v dubnu 2011 v lesní školce Svinošice; každý záhon představoval jednu ze tří variant (LR, LS, LK). Varianty LR a LS byly inokulovány, varianta LK bez inokulace sloužila jako kontrola. Záhony byly od sebe v dostatečné vzdálenosti (cca 100m).

Plodnice hub (*Suillus luteus, Lactarius deliciosus, Suillus variegatus)* určené k inokulaci byly sebrány na Šumavě koncem září roku 2012. Plodnice hub byly vyzrálé, zdravé, u některých byl patrný výtrusný prach. Pro variantu LR bylo použito 15 plodnic klouzka obecného (*Suillus luteus*) a 25 plodnic ryzce pravého (*Lactarius deliciosus*). Plodnice byly rozdrceny vrtačkou s adaptérem pro přípravu stavebních hmot. Rozdrcená směs byla rozmíchána ve vodě o množství 10 l. Pro variantu LS bylo použito 40 plodnic hřibu (klouzka) strakoše (*Suillus variegatus)*. Plodnice byly taktéž rozdrceny a rozmíchány ve vodě o množství 10 l. Varianta LK nebyla uměle inokulována, sloužila pouze jako kontrola.

Inokulace byla uskutečněna dne 2. 10. 2012 v lesní školce Svinošice. Každý záhon varianty LR a LS byl naočkován sporami daných hub pro variantu ve formě suspenze. Obě suspenze obsahovaly inokulum a 10 l vody. Nakonec byl ještě každý záhon zalit vodou o množství cca 40 l kvůli rychlejšímu pohybu spor hub do půdy, které by jinak zůstaly na povrchu záhonů, a k jejich pohybu by bylo zapotřebí přírodních srážek. Varianta LK nebyla inokulována, záhon byl ponechán bez zálivky.

Dvouleté semenáčky borovice lesní byly určeny k výsadbě. K jejich vyzvednutí ze školky ve Svinošicích došlo 12. 4. 2013. Výsadba byla uskutečněna dne 13. 4. 2013. Pozemek, na kterém byla provedena výsadba, se nachází na katastrálním území Rohozec,

je oplocený, mírně svažitý, se severní expozicí, o nadmořské výšce 420 m n. m. Půda na pozemku je lehká s pH 7,2, půdní horizont je mělký. Na stanovišti je trvalý travní porost nevhodný k zemědělskému obhospodařování, proto byl pozemek využíván jako jednosečná louka. Podle původního plánu práce bylo počítáno s kontrolou přetrvávání ektomykorhiz u těchto sazenic po skončení vegetačního období. Vzhledem k tomu, že mezi jednotlivými variantami nebyly zjištěny prokazatelné rozdíly v kolonizaci ektomykorhizními houbami, nebylo již k tomuto kroku přistoupeno.

4.3. CHARAKTERISTIKA HUB POUŽITÝCH K INOKULACI

4.3.1. Klouzek (hřib) strakoš *(Suillus variegatus)*

4.3.1.1. Systematické zařazení dle Mycobank (Robert et. al 2015)

Říše: Houby (*Fungi*)

Kmen: Stopkovýtrusé (*Basidiomycota*)

Třída: Rouškaté (*Agaricomycetes*)

Řád: Hřibotvaré (*Boletales*)

Čeleď: Klouzkovité (*Suillaceae*)

Rod: Klouzek (*Suillus*)

4.3.1.2. Charakteristika

Klobouk bývá 6–15 cm široký, zpočátku polokulovitý, později plochý. Pokožka na klobouku je světle žlutohnědé barvy, za vlhkého počasí mírně slizká. Povrch pokožky klobouku pokrývá hnědo až červenohnědá plsť. V dospělosti dochází k trhání plsti a povrch vypadá strakatě. Rourky jsou zbarvené okrově žlutě, oranžově žlutě, žlutozeleně až olivově zeleně. Po otlačení rourek, dochází k lehkému zmodrání. Ústí rourek je o kousek tmavší, než rourky samotné. Třeň je válcovitého tvaru, dosahuje velikosti 40–100 x 15–35 mm. U báze je bělavý, jinak žlutavý až okrově žlutý, bez prstenu. Dužnina je zbarvena do špinavě bělavé, žlutavé až oranžově žluté. Výtrusný prach má světle olivově hnědé zbarvení (Grünert, Grünertová 1995; Antonín, Hagara 2005).

Klouzek strakoš roste od června do listopadu na písčitých půdách, vytváří mykorhizy s borovicemi se dvěma jehlicemi ve svazečku (Laessoe 2004).

Obr. 1 Plodnice druhu *Suillus variegatus* použitá při umělé inokulaci, září, Šumava, foto R. Loubal

4.3.1.3. Morfologické znaky mykorhizy

Pro mykorhizy druhu *Suillus variegatus* je charakteristické větvení nádorovité. Tvar špiček je nenadutý, cylindrický, vrchol nemá nijak zvláštní tvar. Barva pláště má okrové, žlutavohnědé zbarvení, pokryté tmavšími skvrnkami a vlákny. Povrch pláště je hladký nebo vláknitý až vlněný. Hyfy a rhizomorfy jsou přítomny (Agerer, Rambold 2004-2008)

4.3.2. Klouzek obecný *(Suillus luteus)*

4.3.2.1. Systematické zařazení dle Mycobank (Robert et. al 2015)

Říše: Houby (*Fungi*)

Kmen: Stopkovýtrusé (*Basidiomycota*)

Třída: Rouškaté (*Agaricomycetes*)

Řád: Hřibotvaré (*Boletales*)

Čeleď: Klouzkovité (*Suillaceae*)

Rod: Klouzek (*Suillus*)

4.3.2.2. Charakteristika

Klobouk bývá 5–10 cm široký, nejprve polokulovitý, později plochý. Pokožka na klobouku má zbarvení sytě čokoládově hnědé, výjimečně i žlutohnědé nebo šedohnědé. Povrch pokožky je slizký, snadno sloupnutelný (Garnweidner 2002). Rourky i jejich ústí jsou žlutá až hnědavě žlutá, v mládí jsou překryta bělavým závojem. Z bělavého závoje postupem času zbývá prsten. Třeň je válcovitého tvaru, dosahuje velikosti 40–100 x 10–25 mm. Na vrcholu se zbarvuje do jemně žlutavé, jeho povrch je zrnitý, s drobnou síťkou, k bázi jeho zbarvení přechází do červenohnědé. Dužnina je zbarvena do bíla nebo žluta (Hagara 2006). Výtrusný prach má rezavě okrově hnědou barvu (Grünert, Grünertová 1995).

Klouzek obecný není náročný na půdní podmínky, roste od května do listopadu na kyselých, neutrálních i zásaditých půdách, které nemusí mít vysoký obsah živin.Vytváří mykorhizy s borovicemi se dvěma jehlicemi ve svazečku (Hagara 2006).

Obr. 2 Plodnice druhu *Suillus luteus*, použita při umělé inokulaci, září, Šumava, foto R. Loubal

4.3.3. Ryzec pravý *(Lactarius deliciosus)*

4.3.3.1. Systematické zařazení dle Mycobank (Robert et. al 2015)

Říše: Houby (*Fungi*)

Kmen: Stopkovýtrusé (*Basidiomycota*)

Třída: Rouškaté (*Agaricomycetes*)
Řád: Holubinkotvaré (*Russulales*)
Čeleď: Holubinkovité (*Russulaceae*)
Rod: Ryzec (*Lactarius*)

4.3.3.2. Charakteristika

Klobouk bývá 4–20 cm široký, nejprve nízce vyklenutý, později plochý. Střed klobouku je jakoby vtlačený dovnitř. Pokožka na klobouku má rezavooranžové zbarvení. Na pokožce klobouku se objevují soustředné kruhy, tmavší než je ona sama. Povrch pokožky je za vlhkého počasí lepkavý. Lupeny jsou úzké, zbarvené oranžově nažloutle až oranžově okrové. Po jejich otlačení dochází k zezelenání. Třeň je válcovitého tvaru, dosahuje velikosti 30–70 x 15–5 mm a má stejné zbarvení jako klobouk (Antonín, Hagara 2006). Dužnina je zbarvena do bíla, na okrajích a uvnitř třeně dooranžova. Mléko má oranžovo-červené zbarvení. Výtrusný prach má světle okrovou barvu (Grünert, Grünertová 1995).

Ryzec pravý roste od června do začátku listopadu, na zásaditých i kyselých půdách. Vytváří mykorhizy s borovicí lesní (Hagara 2006).

Obr. 3 Plodnice *Lactarius deliciosus*, použita při umělé inokulaci, září, Šumava, foto R. Loubal

4.3.3.3. Morfologické znaky mykorhizy

Pro mykorhizy *Lactarius deliciosus* je charakteristické větvení dichotomické nebo korálové. Vyskytují se buď samostatně, nebo v malém množství. Tvar ektomykorhiz je rovný. Tvar špiček je nenadutý, cylindrický, vrchol nemá nijak zvláštní tvar. Barva pláště

je hnědá, nebo žlutá či červená. Plášť je pokryt žlutavými či nazelenalými tečkami. Povrch pláště je hladký. Vrchol ektomykorhizní kořenové špičky je zbarven dožluta. Starší ektomykorhizy se zbarvují do tmavě hnědé, až zelené. Kortikální buňky nejsou vidět. Charakteristická je přítomnost oranžového latexu. Hyfy nejsou přítomny. Rhizomorfy se vyskytují zřídka. Jejich barva je hnědá, žlutá, oranžová nebo zelená. Povrch rhizomorf je hladký (Agerer, Rambold 2004-2008).

4.4. BIOMETRICKÉ CHARAKTERISTIKY SEMENÁČKŮ BOROVICE LESNÍ

Z vyzvednutých semenáčků bylo náhodně vybráno 60 ks; pro variantu LK 20 ks, pro variantu LS (*S. variegatus)* 20 ks, pro variantu LR (*L. deliciosus* + *S. luteus*) 20 ks. Semenáčky byly uloženy odděleně do igelitových pytlů, aby nedošlo k oschnutí kořenů a udržovány v chladu do zpracování.

Každý semenáček byl očíslován a byly u něj změřeny tyto biometrické charakteristiky: výška nadzemní části, délka hlavního kořene a tloušťka kořenového krčku (Tab. I, příloha). Nejprve byla změřena výška nadzemní části pomocí provázku, který byl použít kvůli případným nerovnostem a zakřivení kmínku. Provázek kopíroval kmínek po celé jeho délce od kořenového krčku až po terminální pupen a poté byla změřena jeho délka. Stejně probíhalo i měření délky hlavního kořene, který byl měřen od kořenového krčku až po konec jemných kořenů. Tloušťka kořenového krčku byla změřena pomocí posuvného měřítka, jako průměr hodnot ze dvou na sebe kolmých měření. Jako kořenový krček bylo určeno místo, kde viditelně přecházela podzemní část rostliny v nadzemní.

4.5. ODBĚR MYKORHIZ A DOKUMENTACE KOŘENŮ

Odběr mykorhiz byl uskutečněn do tří dnů od vyzvednutí sazenic. Semenáčky byly postupně přesunuty z igelitových pytlů odděleně podle variant do nádob se studenou vodou, aby nedošlo k osychání kořenů.

Kořenový systém každého semenáčku byl v laboratoři důkladně omyt tekoucí vodou, aby se kořeny zbavily hlíny a případných nečistot. Následně byly vybrány tři fragmenty kořenů, (z vrchní, střední a spodní části kořenového systému), tak, aby obsahovaly zhruba

50 mykorhizních špiček. Za horní část kořenového systému byly považovány všechny postranní kořeny, které vyrůstaly z horní třetiny primárního kořene; obdobně pro ostatní dvě části. Každý z fragmentů kořene byl pomocí pinzety a preparační jehly dočištěn od zbytků zeminy i veškerého organického materiálu. Pod stereomikroskopem Olympus SZ10 s připojeným fotoaparátem Olympus Camedia C5050 nebo stereomikroskopem Intraco s připojeným fotoaparátem CANON 1000 byl každý fragment kořene při zvětšení 7,5–10 x několika snímky zdokumentován, tak aby byly zachyceny všechny mykorhizní špičky. Z fragmentu kořenového systému byly vybrány 2–4 kořenové špičky, tak aby byly celkem pro každou variantu získány alespoň 3 vzorky od každého morfotypu ektomykorhiz. Každá špička byla oddělena od kořene, vyfotografována, označena číslem, vložena do mikrozkumavky a zamrazena při −18 °C.

Následně byl semenáček rozstříhán na nadzemní část, kořenovou soustavu, která byla rozdělena na hlavní kořen, jemné kořeny (< 1 mm) a kořeny 2. kategorie (1–2 mm) a 3. kategorie (2–5 mm) pomocí měřítka. Z jednotlivých částí semenáčku (nadzemní část, hlavní kořen a vedlejší kořeny) byla stanovena sušina při teplotě 50 °C, 12 hodin v sušárně ULE 400. Před vlastním vážením byly vzorky znovu hodinu přesušeny.

4.6. EXTRAKCE DNA, PCR, PŘÍPRAVA VZORKŮ NA SEKVENACI

4.6.1. Extrakce genomové DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí kitu Qiagen DNAeasy Plant Kit. Ektomykorhizy byly rozdrceny pomocí tekutého dusíku, a to tak, že mikrozkumavka se zamraženou mykorhizní špičkou byla opakovaně vkládána do nádoby s tekutým dusíkem a drcena sterilním mikrohomogenizátorem.

Dále probíhala izolace DNA kitem DNAeasy Plant kit (Qiagen) pomocí protokolu DNAeasy Plant Mini, který je součástí balení kitu. V kroku jedna bylo do každé zkumavky s rozdrcenou špičkou přidáno 400 µl pufru AP1 (buffer AP1), poté byly přidány 4 µl Rnázy (Rnase A). Zkumavky byly zvortexovány a inkubovány 10 minut při 65 °C. V průběhu inkubace byly 2–3 x převráceny. V kroku dva bylo přidáno 130 µl pufru AP2. Vše bylo smícháno a zkumavky byly inkubovány 5 minut na ledu. Lyzát byl zcentrifugován 5 minut při 20 000x g. V kroku tři byl lyzát přepipetován do QIAshreader

Mini spin kolonky, tak aby nebyl poškozen pelet (usazenina). Následně byly kolonky umístěny v 2 ml sběrných zkumavkách a centrifugovány 2 minuty při 20 000x g. V kroku čtyři byla frakce, která protekla kolonkou, přenesena do nové zkumavky, tak aby nebyl poškozen pelet. Bylo přidáno 1,5 (přibližně 630 µl) objemu pufru AP3/E a promícháno pipetováním. V kroku šest bylo přeneseno 650 µl směsi do DNeasy Mini spin kolonky umístěné v 2 ml sběrné zkumavce. Zcentrifugováno 1 minutu při ≥ 6000x g. To, co proteklo kolonkou, bylo odstraněno. Tento krok byl opakován i se zbytkem vzorku. V kroku sedm byla kolonka umístěna do nové sběrné 2 ml zkumavky. Bylo přidáno 500 µl pufru AW a zkumavka byla centrifugována 1 minutu při ≥ 6000x g. To, co proteklo kolonkou, bylo vylito. V kroku osm bylo přidáno znovu 500 µl pufru AW a centrifugováno 2 minuty při 20 000x g. Kolonka byla opatrně vyjmuta ze sběrné zkumavky, tak aby nepřišla do kontaktu s tím, co proteklo. V kroku devět byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a bylo přidáno 75 µl pufru AE (Elution buffer), aby se rozpustila (eluovala) DNA. Zkumavka byla inkubována při pokojové teplotě 7 minut a centrifugována 1 minutu při ≥ 6000x g. Genomová DNA byla uchovávána při −20 °C.

4.6.2. Polymerázová řetězová reakce

Pro identifikaci houby, byl pomocí PCR namnožen úsek ITS (Internal Transcribed Spacer), pomocí primerů ITS 1F, ITS 4 (White et al. 1990) Tyto primery jsou specifické pro DNA hub. Složení reakční směsi bylo následující: 17, 5 µl vody, 5 µl bufferu pro MyTaq polymerázu, 0,5 µl primeru ITS 1F, 0,5 µl ITS 4, 0,15 µl polymerázy MyTaq (BIOLINE), 1 µl DNA.

PCR reakce zahrnovala: počáteční cyklus 2 : 30 min při 94 °C, následovalo 37 cyklů po 30 s při 94 °C, 40 s při 55 °C, 30 s při 74 °C a 4 : 30 min závěrečná extenze při 72 °C. Úspěšnost PCR reakce byla hodnocena pomocí gelové elektroforézy. Standardně byl používán 1% agarózový gel v elektroforetickém pufru TBE. Do gelu bylo přidáno barvivo StainG od firmy SERVA , které se váže na DNA. Jako standard pro hodnocení délky a koncentrace DNA byl použit ladder 100 bp, DNA ladder BioLabs. Gel byl vyfocen přes transiluminátor, fotoaparátem Olympus Camedia C-8080.

4.6.3. Příprava vzorků na sekvenaci

K sekvenování byly vybrány vzorky, ve kterých byl viditelný pouze jediný DNA fragment o minimální koncentraci 10 mg/ml. Délka a koncentrace tohoto fragmentu byla odhadnuta srovnáním s 100bp ladderem. Celý obsah PCR zkumavky byl přepipetován do 1,5 ml zkumavky a odeslán. Purifikace PCR produktů a sekvenace byla provedena dodavatelsky firmou Macrogen Inc., Seoul, Korea, pomocí automatického sekvenátoru ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Výsledky sekvenování byly dodány v elektronické podobě.

4.7. IDENTIFIKACE SEKVENCÍ

Každý vzorek byl dodán s textovým souborem se sekvencí nukleotidů ve formátu FASTA a se souborem s koncovkou abl, který obsahoval elektroforetogram. Elektroforetogram sekvence byl prohlížen v programu Finch TV (Geospiza), úseky nižší kvality na koncích sekvence byly ořezány.

Sekvence jednotlivých vzorků byly porovnány v databázi GenBank – NCBI) a databází UNITE (Abarenkov et al. 2010), (Tab. III, příloha). Kritériem pro identifikaci druhů byla minimálně 98% podobnost ITS úseku.

4.8. URČOVÁNÍ MORFOTYPŮ

Termínem morfotyp je označován typ ektomykorhizy charakterizovaný na základě morfologických a anatomických znaků. Vzhledem k finanční a časové náročnosti molekulárně biologických metod sekvenovat nelze DNA houbového symbionta každé špičky. Proto se nejprve rozlišily morfotypy ektomykorhiz (na základě fotografií) a jen několik vzorků rozlišených morfotypů bylo sekvenováno.

Rozdíl mezi mykorhizní a nemykorhizní špičkou se pozná většinou podle přítomnosti houbového pláště a dalších morfologických znaků (bobtnání kořenové spičky). Další rozdíl spočívá v tom, že na mykorhizní špičce nenajdeme kořenové vlášení, zatímco u semenáčků je u nemykorhizních špiček vytvořeno. Mykorhizní špička se na rozdíl od nemykorhizní často větví. Při kvantifikaci špiček byla za mykorhizní špičku považována

špička, jejíž délka je větší, než šířka. Morfotypy byly rozlišovány podle morfologických znaků: plášť, přítomnost hyf, charakter větvení, zahýbání a zaškrcování a tvar a barva vrcholu špiček. Na houbovém plášti byla pozorována jeho barva a povrch. Hyfy byly sledovány z hlediska jejich přítomnosti. Dalším kritériem byl výskyt rhizomorf. Rhizomorfa je útvar, který je složený ze svazku navzájem srostlých hyf. Charakter větvení byl posuzován z hlediska výskytu špiček, zda se vyskytují jednotlivě, či v charakteristických strukturách (Agerer, Rambold 2004-2008).

Jako kontrola přiřazení ektomykorhizních druhů hub k jednotlivým morfotypům podle morfologických znaků byla použita internetová databáze DEEMY (Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae) (Agerer, Rambold 2004-2008). Výsledky sekvenování byly konfrontovány s rozlišením morfotypů a byly vybrány další vzorky k sekvenaci pro upřesnění morfologické klasifikace. Odebrané mykorhizy byly zhodnoceny v programu excel pomocí výsečových grafů, z hlediska výskytu druhu v určité části kořenového systému.

4.9. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

4.9.1. Porovnání biometrických charakteristik variant semenáčků statistickým programem Statistica

U jednotlivých semenáčků z varianty byl ze změřených biometrických parametrů (výška nadzemní části, tloušťka kořenového krčku, délka kořenového systému, biomasa nadzemní části, biomasa hlavního kořene, biomasa vedlejších kořenů) vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Zjištění rozdílů mezi variantami bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (ANOVA).

Aby mohla být analýza rozptylu provedena, bylo třeba ověřit, zda biometrická data semenáčků splňují parametry normálního rozložení, či nikoliv. Normalita dat byla testována pomocí Shapiro-Wilkova testu. Jestliže by nebyl splněn předpoklad normality, byl by proveden Kruskal Wallisův test, který je neparametrickou obdobou ANOVY. Následně by byla zjišťována homogenita rozptylu dat, pomocí Levenova testu. Zjišťovalo by se, zda jsou rozptyly homogenní, nebo nejsou. V případě nesplnění předpokladu homogenity rozptylu, by byla použita Welchova Anova. Když bylo zjištěno normálního

rozložení dat a homogenita rozptylu, mohla být použita analýza rozptylu (ANOVA). Jestliže byl analýzou rozptylu zjištěn statisticky významný rozdíl, byla data dále testována Tukeyovým testem. Testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05 a 0,01.

4.9.2 Hodnocení výskytu morfotypů na semenáčcích pomocí mnohorozměrné analýzy Canoco

Data popisující výskyt ektomykorhiz na kořenovém systému jednotlivých semenáčků byly zpracovány analýzou DCA a CCA v programu Canoco (Ter Braak & Šmilauer 1998). Počty ektomykorhiz jednotlivých morfotypů na třech vybraných kořenech semenáčku byly použity jako závislé proměnné (dependent variables). Následující biometrické parametry semenáčků byly použity jako vysvětlující proměnné: varianta pokusu (LS-inokulace, LR-inokulace, LK-kontrola), délka kořenového systému, výška nadzemní části, tloušťka kořenového krčku, nadzemní biomasa hlavního kořene, biomasa vedlejších kořenů, biomasa hlavních a vedlejších kořenů. Vliv vysvětlujících proměnných na zastoupení ektomykorhiz byl testován Monte Carlo permutačním testem. Vzorky s extrémními hodnotami byly z analýzy vyloučeny (LR 12, LK 2, LS 19).

Abychom zjistili, jestli existuje vztah mezi výskytem morfotypu ektomykorhizy a polohou na kořenovém systému, analyzovali jsme počty morfotypů ektomykorhiz na jednotlivých kořenech z dolní, střední a horní části kořenového systému. Část kořenového systému byla použita jako vysvětlující proměnná; identifikace sazenice byla použita jako kovariáta.

5. VÝSLEDKY

5.1. BIOMETRICKÉ CHARAKTERISTIKY SEMENÁČKŮ BOROVICE LESNÍ

Rozdíly mezi jednotlivými variantami (LK, LR a LS) na základě průměrů a směrodatných odchylek biometrických charakteristik semenáčků byly zjišťovány analýzou rozptylu (ANOVA).

Z výsledků analýzy rozptylu (ANOVY) vyplývá, že mezi jednotlivými variantami (LK, LR a LS) nebyl prokázán statisticky významný rozdíl z hlediska výšky nadzemní části, tloušťky kořenového systému, sušiny nadzemní části, hlavního kořene, vedlejších kořenů a všech kořenů. U jediného parametru, a to délky hlavního kořene, byl prokázán statisticky významný rozdíl; semenáčky v neinokulované variantě LK měly delší hlavní kořen oproti inokulovaným variantám.

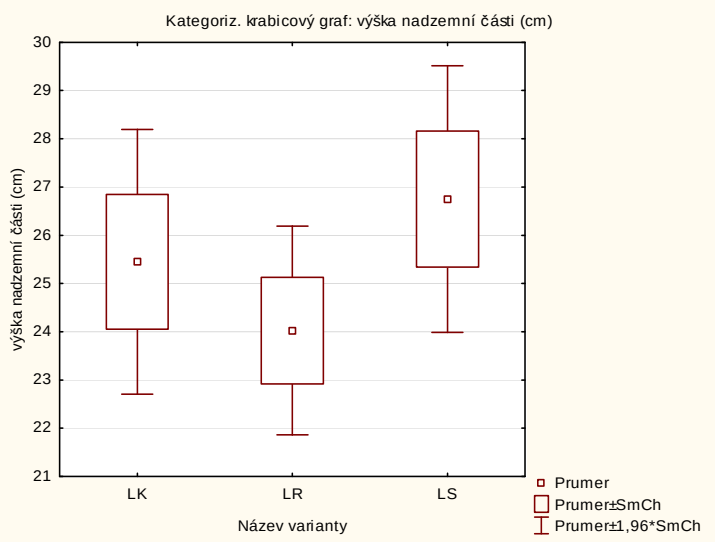
5.1.1. Výška nadzemní části semenáčků

V tabulce (Tab. 2) jsou zaznamenány průměrné hodnoty výšky nadzemní části semenáčků u varianty LK, LR a LS s jejich směrodatnými odchylkami.

Z grafu (Obr. 4) je patrné, že rozložení dat v každé variantě je symetrické kolem průměru. Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých variant semenáčků bylo provedeno při splnění předpokladů pomocí analýzy rozptylu. Veškeré testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Tab. 2 Průměrné hodnoty variant výšky nadzemní části a jejich směrodatné odchylky

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	výška nadzemní části (cm) průměr	výška nadzemní části (cm) N	výška nadzemní části (cm) Sm.odch.
LK	25,45000	20	6,257417
LR	24,02500	20	4,935039
LS	26,75000	20	6,298496
Vš.skup.	25,40833	60	5,872582



Obr. 4 Graf průměrných hodnot variant výšky nadzemní části semenáčků s jejich směrodatnými odchylkami z tabulky Tab. 2, znázorněné pomocí krabicového grafu

5.1.1.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Na základě výsledků Shapirova-Wilkova testu normality dat (Obr. IV, příloha), bylo zjištěno, že p-hodnoty jsou větší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulová hypotéza o normalitě dat nebyla zamítnuta, data jsou normálně rozložena.

Výsledky p-hodnot Levenova testu, homogenity rozptylu dat (Tab. V, příloha), byly větší než hladina významnosti 0,05. Nulová hypotéza nebyla zamítnuta, rozptyly jsou ve všech variantách homogenní. Předpoklady pro použití analýzy rozptylu byly splněny.

5.1.1.2. Analýza rozptylu (ANOVA)

Z vysledků p-hodnot analýzy rozptylu (Tab. VI, příloha) vyplývá, že jsou větší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulová hypotéza o shodě průměrů nebyla zamítnuta. Mezi jednotlivými variantami nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v výšce nadzemní části.

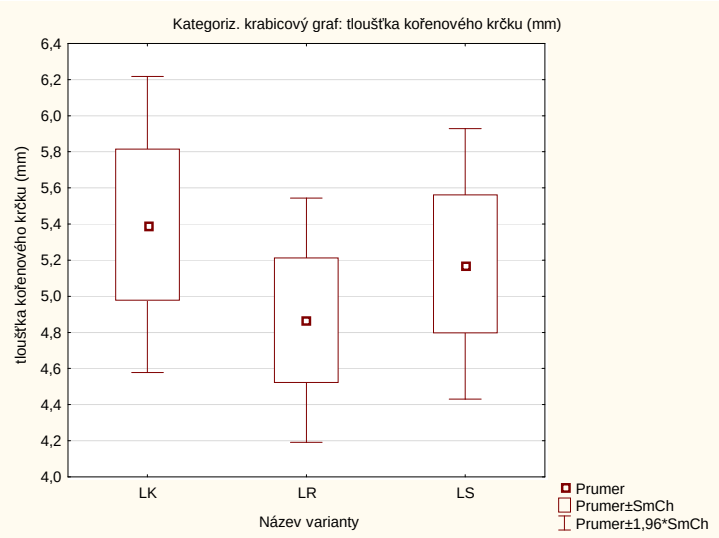
5.1.2. Tloušťka kořenového krčku

V tabulce (Tab. 3) jsou zaznamenány průměrné hodnoty tloušťky kořenového krčku u varianty LK, LR a LS a jejich směrodatnými odchylkami. Graf na Obr. 5 znázorňuje rozložení dat v každé variantě semenáčků, které je symetrické kolem průměru. Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých

variant semenáčku bylo provedeno při splnění předpokladů pomocí analýzy rozptylu. Veškeré testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Tab. 3 Průměrné hodnoty variant tloušťky kořenového krčku a jejich směrodatné odchylky

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	tloušťka kořenového krčku (mm) průměr	tloušťka kořenového krčku (mm) N	tloušťka kořenového krčku (mm) Sm.odch.
LK	5,397000	20	1,870030
LR	4,868000	20	1,542225
LS	5,179500	20	1,708211
Vš.skup.	5,148167	60	1,696974



Obr. 5 Graf průměrných hodnot tloušťky kořenového krčku u variant semenáčků s jejich směrodatnou odchylkou z tabulky Tab. 3, znázorněné pomocí krabicového grafu

5.1.2.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Z výsledků Shapirova-Wilkova testu normality dat (Obr. VII, příloha), bylo zjištěno, že p-hodnoty jsou větší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulová hypotéza o normalitě dat nebyla zamítnuta, data jsou normálně rozložená. Výsledky p-hodnot Levenova testu, homogenity rozptylu dat (Tab.VIII, příloha), byly větší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulová hypotéza nebyla zamítnuta, rozptyly jsou ve všech variantách homogenní. Předpoklady pro použití analýzy rozptylu byly splněny.

5.1.2.2. Analýza rozptylu (ANOVA)

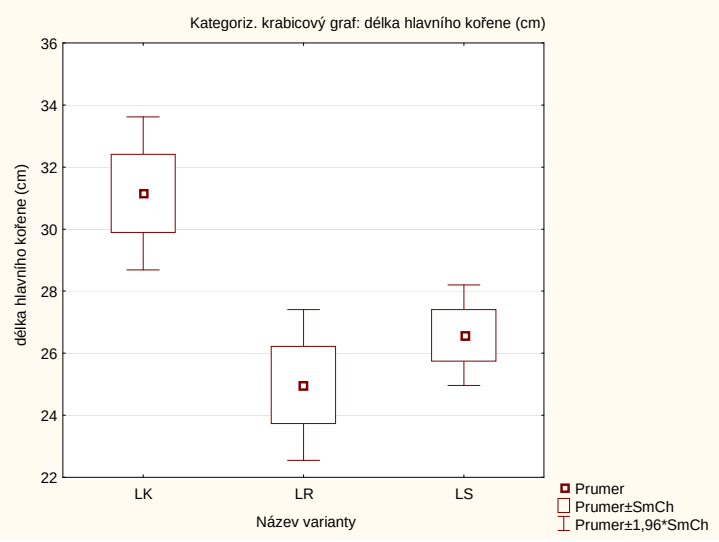
Na základě výsledků p-hodnoty analýzy rozptylu (Tab. IX, příloha), která je větší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o shodě průměrů (středních hodnot) nebyla zamítnuta. Mezi jednotlivými variantami semenáčků nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v tloušťce kořenového krčku.

5.1.3. Délka hlavního kořene

V tabulce (Tab. 4) jsou zaznamenány průměrné hodnoty délky hlavního kořene u varianty LK, LR a LS, s jejich směrodatnými odchylkami. Z grafu na Obr. 6 vyplývá, že rozložení dat v každé variantě je symetrické kolem průměru. Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých variant bylo provedeno při splnění předpokladů pomocí analýzy rozptylu.

Tab. 4 Průměrné hodnoty variant délky hlavního kořene a jejich směrodatné odchylky

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	délka hlavního kořene (cm) průměr	délka hlavního kořene (cm) N	délka hlavního kořene (cm) Sm.odch.
LK	31,15000	20	5,624430
LR	24,97500	20	5,557060
LS	26,57500	20	3,700196
Vš.skup.	27,56667	60	5,612838



Obr. 6 Graf průměrných hodnot délky hlavního kořene u variant semenáčků s jejich směrodatnou odchylkou z tabulky Tab. 4, znázorněné pomocí krabicového grafu

5.1.3.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Z výsledků p-hodnot Shapiro-Wilkova testu normality (Obr. X, příloha), které jsou ve všech případech větší než zvolená hladina významnosti 0,05 je zřejmé že nulová hypotéza o normalitě dat nebyla zamítnuta. Data jsou považována za normálně rozložená. Pomocí Levenova testu pro homogenitu rozptylu (Tab. XI, příloha), vyšly p-hodnoty větší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o homogenitě rozptylů nebyla zamítnuta. Rozptyly jsou ve všech variantách semenáčků homogenní. Předpoklady pro použití analýzy rozptylu byly splněny.

5.1.3.2. Analýza rozptylu (ANOVA)

P-hodnoty analýzy rozptylu (Tab. XII, příloha), vyšly menší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o shodě průměru (středních hodnot) byla zamítnuta.

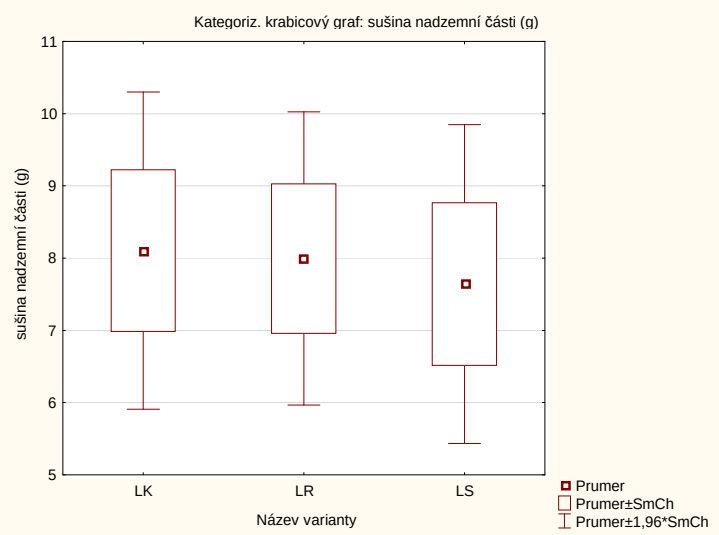
Alespoň u dvou variant byl prokázán statisticky významný rozdíl v délce hlavního kořene. Pomocí Tukeyova testu (Tab. XIII, příloha) mnohonásobného porovnávání bylo zjištěno, že statisticky významný rozdíl byl pozorován mezi variantami LK a LR a také mezi LK a LS.

5.1.4. Sušina nadzemní části

V tabulce (Tab. 5) jsou zaznamenány průměrné hodnoty sušiny nadzemní části u variant LK, LR a LS s jejich směrodatnými odchylkami. Rozložení dat v každé variantě semenáčků je symetrické kolem průměru (Obr. 7). Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých variant bylo provedeno při splnění předpokladů pomocí analýzy rozptylu. Veškeré testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Tab. 5 Průměrné hodnoty variant sušiny nadzemní části a jejich směrodatné odchylky

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	sušina nadzemní části (g) průměr	sušina nadzemní části (g) N	sušina nadzemní části (g) Sm.odch.
LK	8,104850	20	5,006870
LR	7,995500	20	4,627890
LS	7,641700	20	5,031580
Vš.skup.	7,914017	60	4,812765



Obr. 7 Graf průměrných hodnot sušiny nadzemní části u variant semenáčků s jejich směrodatnou odchylkou z tabulky Tab. 5, znázorněné pomocí krabicového grafu

5.1.4.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Výsledné p-hodnoty z Shapiro-Wilkova testu normality (Obr. XIV, příloha), jsou ve všech případech větší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o normalitě dat nebyla zamítnuta. Data jsou tedy považována za normálně rozložená. Z výsledků p-hodnoty Levenova testu homogenity rozptylu (Tab. XV, příloha), bylo zjištěno, že zvolená hladina významnosti 0,05 je menší. Předpoklady pro použití analýzy rozptylu byly splněny.

5.1.4.2. Analýza rozptylu (ANOVA)

Na základě p-hodnoty analýzy rozptylu (Tab. XVI, příloha), která je větší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o shodě průměrů (středních hodnot) nebyla zamítnuta. Mezi jednotlivými variantami semenáčků nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu sušiny v nadzemní části.

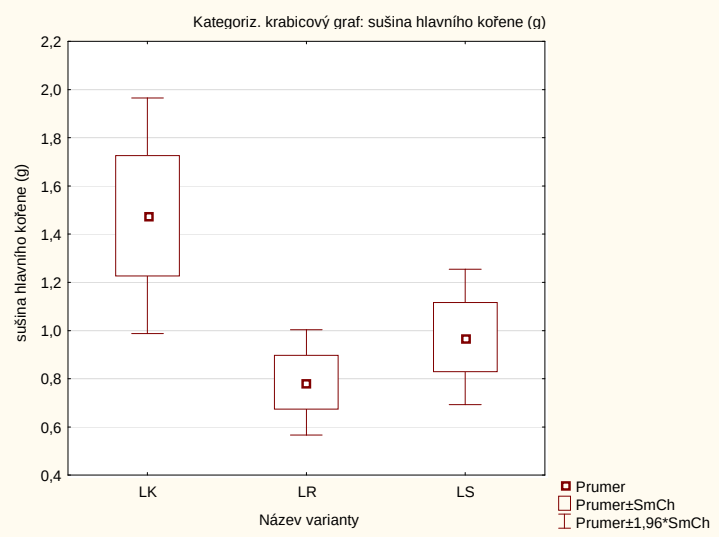
5.1.5. Sušina hlavního kořene

V tabulce (Tab. 6) jsou zaznamenány průměrné hodnoty sušiny hlavního kořene u variant LK, LR a LS s jejich směrodatnými odchylkami. Rozložení dat v každé variantě semenáčků je symetrické kolem průměru (Obr. 8). Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých variant bylo provedeno při splnění

předpokladů pomocí analýzy rozptylu. Veškeré testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Tab. 6 Průměrné hodnoty variant sušiny hlavního kořene a jejich směrodatné odchylky

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	sušina hlavního kořene (g) průměr	sušina hlavního kořene (g) N	sušina hlavního kořene (g) Sm.odch.
LK	1,475700	20	1,115701
LR	0,784900	20	0,498278
LS	0,972700	20	0,640903
Vš.skup.	1,077767	60	0,836416



Obr. 8 Graf průměrných hodnot sušiny hlavního kořene u variant semenáčků s jejich směrodatnou odchylkou z tabulky Tab. 6, znázorněné pomocí krabicového graf

5.1.5.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Shapiro-Wilkovův test normality (Obr. XVII, příloha), zjistil že p-hodnoty jsou ve všech případech větší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o normalitě dat nebyla tedy zamítnuta. Data jsou považována za normálně rozložená.

Výsledky p-hodnoty Levenova testu homogenity rozptylů (Tab. XVIII, příloha), vyšly menší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o homogenitě rozptylů byla zamítnuta. Rozptyly nejsou ve všech variantách stejné. Díky nesplnění předpokladu homogenity rozptylu, byla použita Welchova ANOVA.

5.1.5.2. Welchova analýza rozptylu

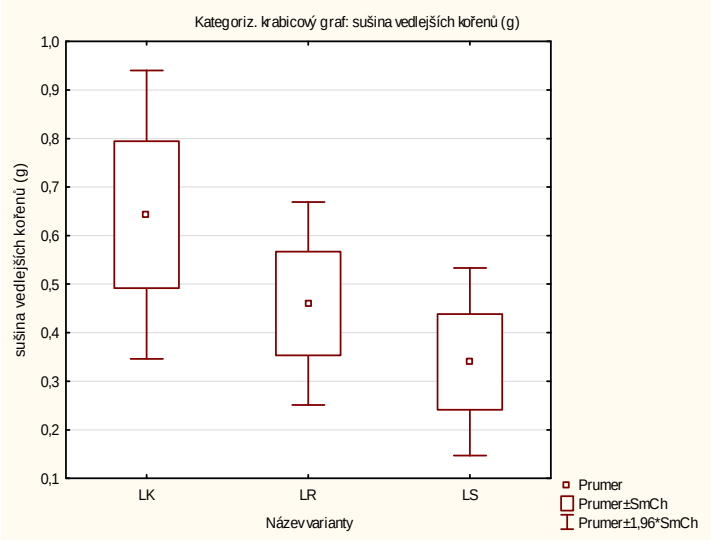
Z výsledků Welchovy analýzy rozptylu (Tab. XIX, příloha) vyplývá, že p-hodnota je větší než zvolená hladina významnosti 0,01, nulová hypotézu o shodě průměrů (středních hodnot) nebyla zamítnuta. Mezi jednotlivými variantami semenáčků nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu sušiny v hlavním kořenu.

5.1.6. Sušina vedlejších kořenů

V tabulce (Tab. 7) jsou zaznamenány průměrné hodnoty sušiny vedlejších kořenů u variant LK, LR a LS s jejich směrodatnými odchylkami. Rozložení dat v každé variantě je symetrické kolem průměru (Obr. 9). Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých variant semenáčků bylo provedeno při splnění předpokladů pomocí analýzy rozptylu. Veškeré testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Tab. 7 Průměrné hodnoty variant sušiny vedlejších kořenů a jejich směrodatné odchylky

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	sušina vedlejších kořenů (g) průměr	sušina vedlejších kořenů (g) N	sušina vedlejších kořenů (g) Sm.odch.
LK	0,643150	20	0,677096
LR	0,460100	20	0,477325
LS	0,340100	20	0,440527
Vš.skup.	0,481117	60	0,547081



Obr. 9 Graf průměrných hodnot sušiny vedlejších kořenů u variant semenáčků s jejich směrodatnou odchylkou z tabulky Tab. 7, znázorněné pomocí krabicového graf

5.1.6.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Výsledky p-hodnot Shapiro-Wilkova testu normality (Obr. XX, příloha), jsou ve všech případech menší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza o normalitě dat byla zamítnuta. Data nejsou normálně rozložená. Z důvodu nesplnění předpokladu normality, byl použit k ověření shody středních hodnot, neparametrický, obdobný test analýzy rozptylu, Kruskal-Wallisův test.

5.1.6.2. Kruskal-Wallisův test

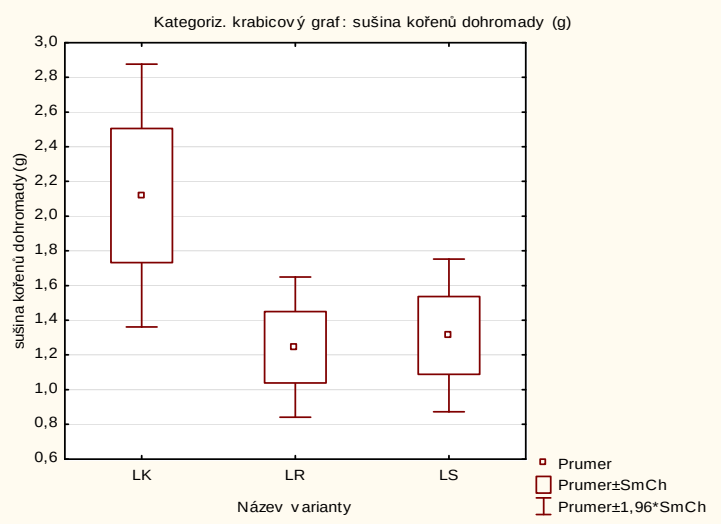
Z výsledků p-hodnot Kruskal-Wallisova testu (Tab. XXI, příloha), vyplývá, že zvolená hladina významnosti 0,05, byla menší. Nulová hypotéza o shodě průměrů (středních hodnot) nebyla zamítnuta. Mezi jednotlivými variantami semenáčků nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu sušiny ve vedlejších kořenech.

5.1.7. Sušina všech kořenů

V tabulce (Tab. 8) jsou zaznamenány průměrné hodnoty variant LK, LR a LS s jejich směrodatnými odchylkami. Z obrázku 10 je vidět, že rozložení dat v každé variantě semenáčků je symetrické kolem průměru. Ve výběrech se nevyskytují žádné odlehlé ani extrémní hodnoty. Porovnání jednotlivých variant semenáčků bylo provedeno při splnění předpokladů pomocí analýzy rozptylu. Veškeré testy byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Tab. 8 Průměrné hodnoty a jejich směrodatné odchylky sušiny všech kořenů u jednotlivých variant semenáčků

Rozkladová tabulka popisných statistik N=60			
Název varianty	sušina kořenů dohromady (g) průměr	sušina kořenů dohromady (g) N	sušina kořenů dohromady (g) Sm.odch.
LK	2,118850	20	1,726992
LR	1,245000	20	0,920478
LS	1,312800	20	1,002759
Vš.skup.	1,558883	60	1,310477



Obr. 10 Graf průměrných hodnot sušiny všech kořenů u variant semenáčků a jejich směrodatné odchylky z tabulky Tab. 8, znázorněné pomocí krabicového graf

5.1.7.1. Ověření předpokladů pro použití analýzy rozptylu (ANOVA)

Na základě p-hodnoty Shapiro-Wilkova testu normality (Obr. XXII, příloha), které je v jednom případě menší než zvolená hladina významnosti 0,05, byla nulová hypotéza o normalitě dat zamítnuta. Data nemohou být považovány za normálně rozložená.

5.1.7.2. Kruskal-Wallisův test

Z výsledků p-hodnoty Kruskal-Wallisova testu (Tab. XXIII, příloha), která je větší než zvolená hladina významnosti 0,05, nebyla nulová hypotéza o shodě průměrů (středních hodnot) zamítnuta. Mezi jednotlivými variantami semenáčků nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu sušiny ve všech kořenech.

5.2. DRUHOVÉ SLOŽENÍ SPOLEČENSTVA EKTOMYKORHIZNÍCH HUB

V lesní školce Svinošice bylo vyzvednuto 60 ks semenáčků (20 ks varianta LK, 20 ks varianta LR, 20 ks varianta LS). Celkem bylo hodnoceno 3 404 ektomykorhizních špiček, z toho bylo u varianty LK hodnoceno 972 ektomykorhizních špiček, u varianty LR 1037 ektomykorhizních spiček a u varianty LS 1395 ektomykorhizních špiček.

Ektomykorhizní špičky byly předběžně klasifikovány do morfotypů; přednostně byly vybrány na identifikaci houbových symbiontů pomocí srovnání sekvence ITS DNA ty morfotypy, které se podle databáze DEEMY (Agerer, Rambold 2004-2008) podobaly morfotypům inokulovaných hub. Identifikace mykorhizních symbiontů byla provedena celkem třikrát, v květnu 2013, červenci 2013 a srpnu 2014 (viz Tab. II, příloha). V květnu 2013 bylo vybráno 30 vzorků ektomykorhiz; ze 14 z nich byla vyizolována DNA a získáno 11 sekvencí ITS rDNA. Srovnáním se sekvencemi v databází Unite a GenBank (viz Tab. III, příloha.) byly identifikováni tito symbionti: varianta LK: *Rhizopogon roseolus;* varianta LR: *Tuber* sp. (3x), *Hebeloma* sp., *Meliniomyces* sp., *R. roseolus* (2x); varianta LS: *Peziza sp.* (2x), *R. roseolus.* Protože dva druhy: *Tuber* sp. a *Peziza* sp. vytvářely velmi podobné morfotypy, pouhým okem těžce rozlišitelné, proběhl další výběr vzorků, aby bylo možné tyto ektomykorhizy lépe rozpoznat a odlišit je pomocí morfologických znaků.

Na další analýzu, která byla provedena v červenci 2013, bylo vybráno celkem 26 vzorků ektomykorhiz. Z 15 z nich byla vyizolována DNA a získáno 12 sekvencí ITS rDNA. Srovnáním se sekvencemi v databází Unite a GenBank byli identifikováni tito symbionti: varianta LK: *Rhizopogon* sp. (2x), *Tuber borchii* (3x), *Wilcoxina mikolae*(2x); varianta LR: *Peziza ostracoderma, Rhizopogon roseolus;* varianta LS: *Meliniomyces bicolor, Peziza ostracoderma* (2x). Mezi výsledky vyšel nový druh oproti výsledkům z května, *M. bicolor*, který byl velice těžce rozpoznatelný od morfotypu *W. mikolae*.

V srpnu 2014 proběhl poslední výběr morfotypů pro analýzu DNA, se zaměřením na rozlišení *Wilcoxina* a *Meliniomyces*. Celkem bylo vybráno 6 vzorků ektomykorhiz. Ze všech vzorků byla vyizolována DNA a získáno 6 sekvencí ITS rDNA. Srovnáním se sekvencemi v databází Unite a GenBank byli identifikováni tito symbionti: varianta LK: *Rhizopogon* sp.; varianta LR: *Meliniomyces* sp.*;* varianta LK: *Tuber* sp. (2 x), *Peziza ostracoderma.* Mezi nalezenými druhy ektomykorhiz byl na základě vlastních zkušeností konzultantky určen druh *Cenococcum* sp. Metodou ITS rDNA bylo celkem určeno 35 vzorků. Identifikace ostatních ektomykorhiz byla zpřesněna na základě morfologického srovnání s těmito vzorky (Tab. 9).

Ektomykorhizní houby z inokulace na kořenovém systému inokulovaných semenáčků nebyly nalezeny.

Tab. 9 Morfologické znaky morfotypů ektomykorhiz

druh ektomykorhizy	barva pláště	povrch pláště	přítomnost hyf	přítomnost a barva rhizomorf	větvení ektomykorhiz	tvar ektomykorhiz	tvar a barva špičky
***Rhizopogon* sp.**	bílá	drsný, často obalený částečkami půdy	ano	ano, bílé	často nádorovité, dvojité vidličky	klikatý	nenadutá, bílá
***Tuber* sp.**	oranžová	chloupkatý	většinou ano	ne	dichotomické, často dvojité vidličky	soudečkovitý	nadutá, na konci kyjovitá, bílo-oranžová
***Peziza* sp.**	oranžová	nerovný	občas ano	ne	dichotomické, často dvojité vidličky	občas žaškrcený	špička se směrem k vrcholu zužuje, bílá
***Meliniomyces* sp.**	béžová	síťovitý, tvořený černými chloupky	ano	ne	většinou se moc nevětví	kostrbatě se kroutící	nenadutá, bílá
***Wilcoxina* sp.**	hnědá	síťovitý bez chloupků	ne	ne	většinou se moc nevětví	kostrbatě se kroutící	nadutá, tvar šipky, bílá
***Hebeloma* sp.**	černá	hustě chloupkatý až vlněný	ano	ne	většinou se nevětví	klikatý	nadutá
***Cenococcum* sp.**	černá	chloupkatý	ano	ne	většinou nebylo vidět větvení	zaškrcený	nadutý

5.2.1. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz z hlediska jejich polohy v kořenovém systému

Ze všech odebraných, pojmenovaných morfotypů byly na základě varianty a polohy jejich výskytu na kořenovém systému (horní, střední, dolní) zhotoveny grafy procentuálního zastoupení druhů ektomykorhizních hub.

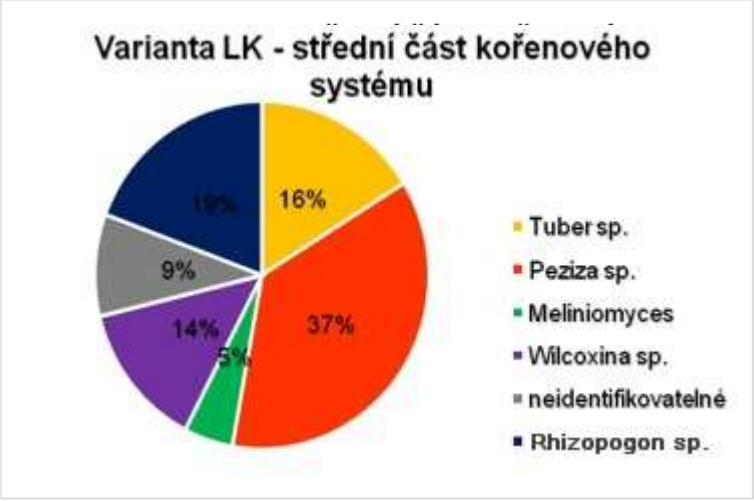
5.2.1.1. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz u varianty LK

Na horní kořenové části semenáčků, u varianty LK byl z odebraných ektomykorhiz nejvíce procentuálně zastoupen druh *Tuber* sp., *Wilcoxina* sp. a *Peziza* sp. (Obr. 11).

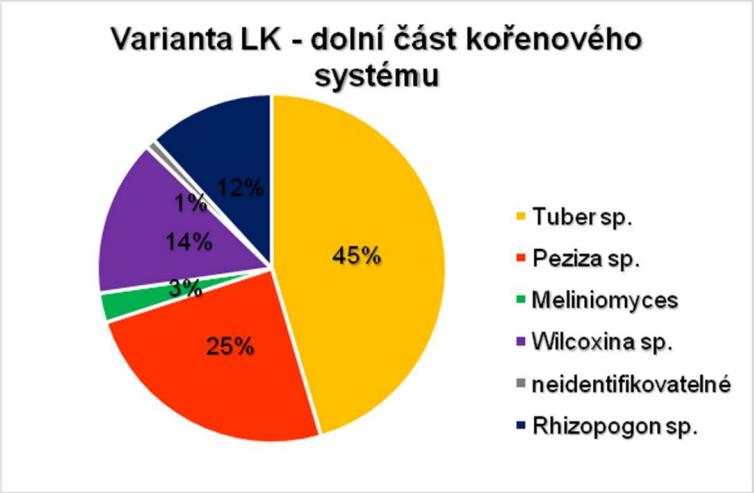
Ve střední kořenové části semenáčků, u varianty LK byl z vybraných ektomykorhiz nejvíce určován druh *Peziza* sp., *Rhizopogon* sp., a *Tuber* sp. (Obr. 12)

Na dolní pozici kořenového systému semenáčků, u varianty LK byl z odebraných ektomykorhiz nejčastěji určován druh *Tuber* sp., *Peziza* sp., *Wilcoxina* sp. (Obr. 13).

Obr. 11 Výskyt druhů ektomykorhiz na horní části kořenového systému, u varianty LK



Obr. 12 Výskyt druhů ektomykorhiz na střední části kořenového systému, u varianty LK



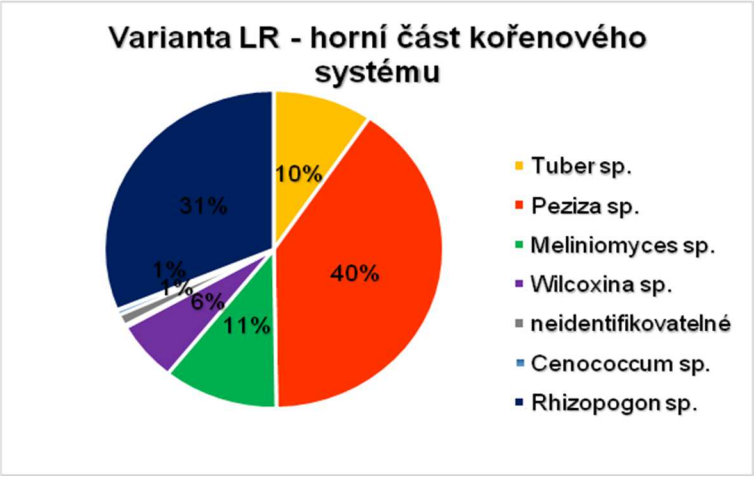
Obr. 13 Výskyt druhů ektomykorhiz na dolní části kořenového systému, u varianty LK

5.2.1.2. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz u varianty LR

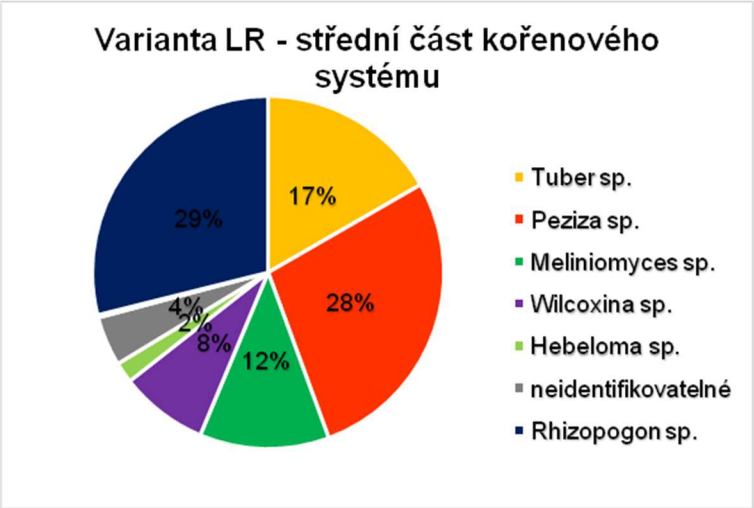
Na horní kořenové části semenáčků, u varianty LR byl z odebraných ektomykorhiz nejvíce procentuálně zastoupen druh *Peziza* sp., *Rhizopogon* sp. a *Meliniomyces* sp. (Obr. 14).

Ve střední kořenové části semenáčků, u varianty LR byl z vybraných ektomykorhiz nejvíce určován druh *Peziza* sp., *Rhizopogon* sp. a *Tuber* sp. (Obr. 15).

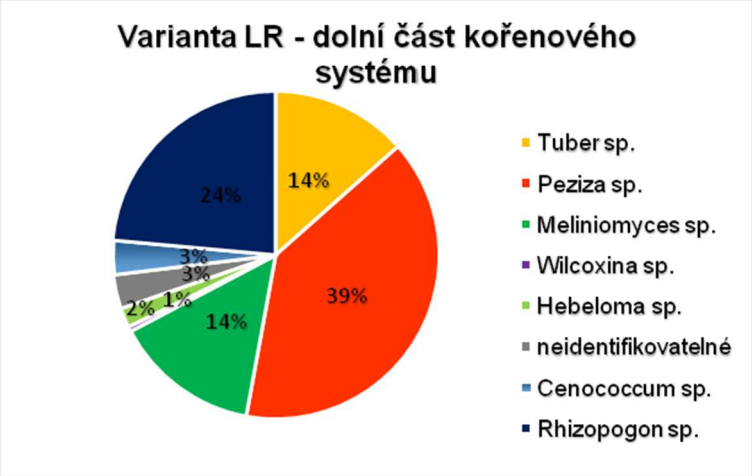
Na dolní pozici kořenového systému semenáčků, u varianty LR byl z odebraných ektomykorhiz nejčastěji určován druh *Peziza* sp., *Rhizopogon* sp., *Tuber* sp. (Obr. 16).



Obr. 14 Výskyt druhů ektomykorhiz na horní části kořenového systému, u varianty LR



Obr. 15 Výskyt druhů ektomykorhiz na střední části kořenového systému, u varianty LR



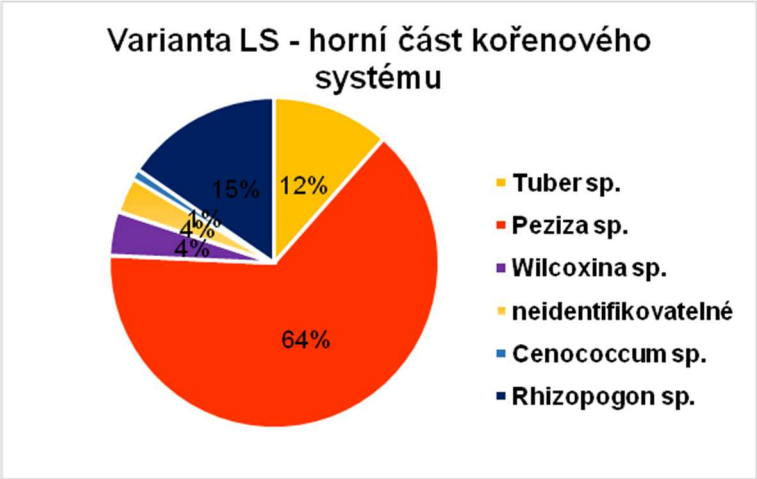
Obr. 16 Výskyt druhů ektomykorhiz na dolní části kořenového systému, u varianty LR

5.2.1.3. Procentuální zastoupení odebraných druhů ektomykorhiz u varianty LS

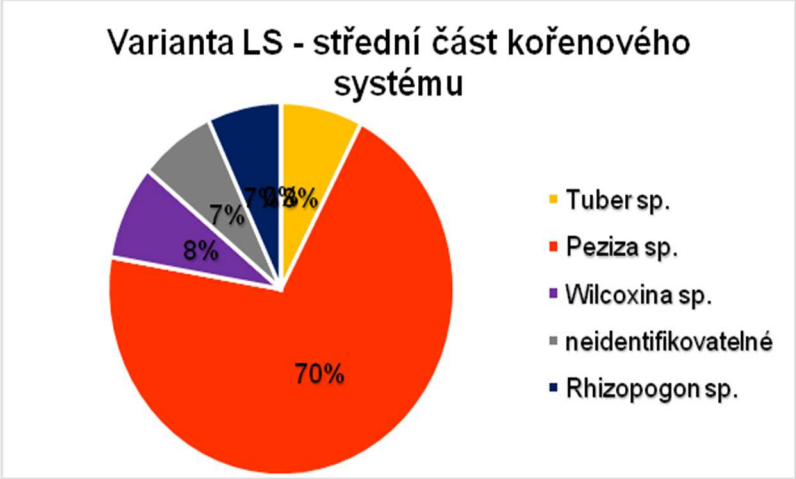
Na horní kořenové části semenáčků, u varianty LS byl z odebraných ektomykorhiz nejvíce procentuálně zastoupen druh *Peziza* sp., *Rhizopogon* sp. a *Tuber* sp. (Obr. 17).

Ve střední kořenové části semenáčků, u varianty LS byl z vybraných ektomykorhiz nejvíce určován druh *Peziza* sp. a *Wilcoxina* sp. (Obr. 18).

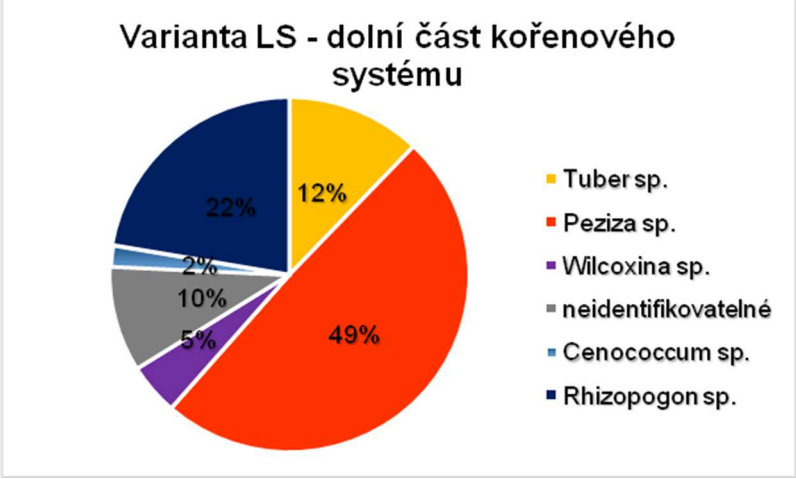
Na dolní pozici kořenového systému semenáčků, u varianty LS byl z odebraných ektomykorhiz nejčastěji určován druh *Peziza* sp., *Rhizopogon* sp., *Tuber* sp. (Obr. 19).



Obr. 17 výskyt druhů ektomykorhiz na horní části kořenového systému, u varianty LS



Obr. 18 Výskyt druhů ektomykorhiz na střední části kořenového systému, u varianty LS



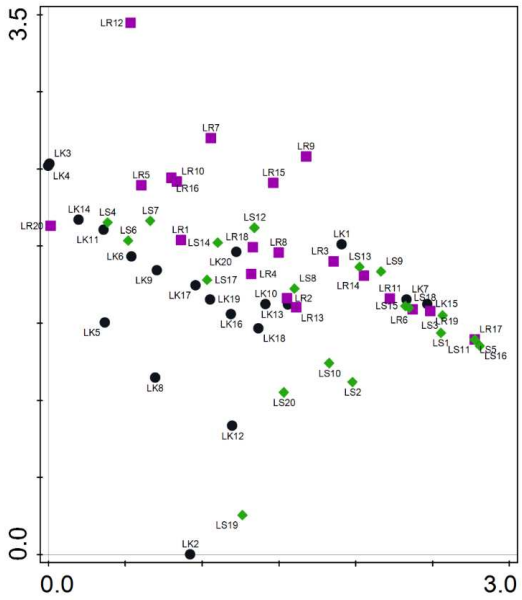
Obr. 19 Výskyt morfotypů ektomykorhiz na dolní části kořenového systému, u varianty LS

5.3. Hodnocení výskytu morfotypů na semenáčcích pomocí mnohorozměrné analýzy Canoco

Data o výskytu morfotypů na semenáčcích byla hodnocena mnohorozměrnou DCA-detrendovanou analýzou a CCA-kanonickou korespondenční analýzou v programu Canoco.Varianta a morfometrické vlastnosti semenáčků byly použity jako vysvětlující proměnné.

Obr. 20 zobrazuje, jak jsou si jednotlivé semenáčky vzájemně podobné z hlediska složení ektomykorhiz na kořenech. První osa postihuje gradient změn výskytu ektomykorhiz mezi variantami LK a LS, druhá osa rozdíly mezi nejvíce odlišnými vzorky LR12, LK2. Výskyt morfotypů byl signifikantně ovlivněn variantou a nadzemní biomasou. Vysvětlená variabilita byla 13,3% (Tab. 10). Jestliže byla použita jako kovariáta biomasa nadzemní části, byla vysvětlená variabilita 10,7 %, když byla použita jako kovariáta varianta, byla vysvětlená variabilita 3,1%.

Biometrické parametry (výška nadzemní části, délka kořenového systému a kořenového krčku) neměly významný vliv na výskyt morfotypů na semenáčcích.



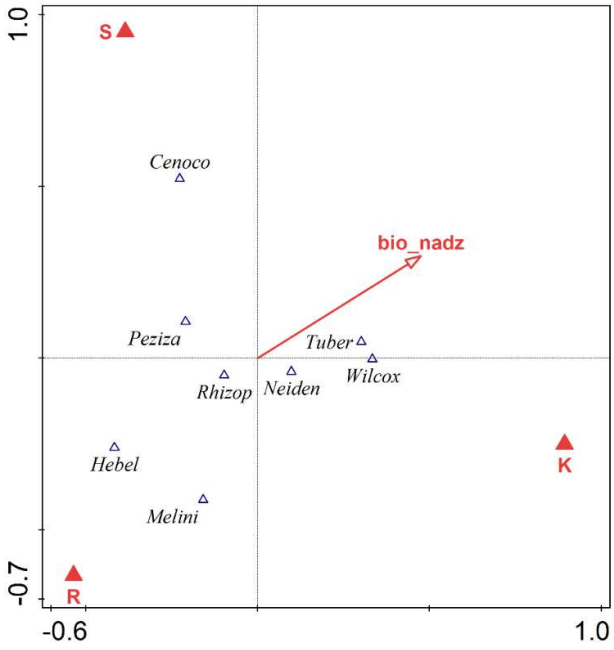
Obr. 20 Výsledky analýzy DCA, znázorňující podobnosti jednotlivých semenáčků z variant LK (černé kolečko), LS (zelený kosočtverec) a LR (fialový čtverec) z hlediska výskytu morfotypů ektomykorhiz na kořenovém systému

Tab. 10 Přehled výsledků CCA, výskytu morfotypů na semenáčku

Vysvětlující proměnná	kovariáta	vysvětlující variabilita (%)	F	p
varianta, biomasa nadzemní části	-	13,3	2,9	0,002
varianta	biomasa nadzemní části	10,7	3,3	0,002
biomasa nadzemní části	varianta	3,1	1,8	0,084

Obr. 21 zobrazuje variabilitu ve výskytu morfotypů na semenáčcích, která je vysvětlená variantou a nadzemní biomasou. Patrný rozdíl je mezi variantou LR a mezi LK (1. osa). Ve variantě LR se vyskytovaly převážně morfotypy *Hebeloma, Meliniomyces* a *Rhizopogon*. Ve variantě LK bylo obsaženo více vzorků s výskytem morfotypů *Wilcoxina, Tuber a* neidentifikovatelné morfotypy. Varianta LK slabě koreluje s nadzemní biomasou, i když z Obr. 7 nicméně vyplývá, že tento rozdíl byl nepatrný. Druhý směr variability, zobrazený 2. osou, je dán rozdílem mezi variantou LR a LS. U varianty LS se častěji vyskytoval morfotyp *Cenococcum*.

Analýza CCA prokázala, že na výskyt morfotypů ektomykorhizních hub semenáčků borovice nemá vliv jejich pozice na kořenovém systému.



Obr. 21 Výsledky analýzy CCA, vyjadřující zastoupení morfotypů v závislosti na variantě a nadzemní biomase semenáčků

6. DISKUSE

Umělá inokulace byla v tomto pokusu neúspěšná. Srovnáním ITS rDNA byli zjištěni jiní ektomykorhizní symbionti než byli použiti k umělé inokulaci. Mezi identifikovanými houbovými symbionty byly určeny druhy: *Peziza* sp., *Tuber* sp., *Meliniomyces* sp., *Wilcoxina* sp., *Rhizopogon* sp. a *Hebeloma* sp.

V práci Menkise et al. (2005), která se zabývala přirozenými ektomykorhizními druhy hub, osídlujícími sazenice borovice lesní a smrku ztepilého v lesních školkách, byly sekvenováním zjištěny tyto ektomykorhizní druhy hub: *Rhizopogon roseolus, Wilcoxina* sp., *Wilcoxina mikolae, Cenococum* sp., *Hebeloma* sp., *Tuber* sp. To se z větší části shoduje s mými výsledky. Osídlení kořenů semenáčků může být ovlivněno různými faktory, mezi jinými i genotypem hostitelské dřeviny Semenáčky, které byly stejně staré a pěstované ve stejných podmínkách se lišily svoji velikostí. U stromu většího vzrůstu byla zaznamenána větší rozmanitost ektomykorhizních hub než u stromů menšího vzrůstu (Korkama et al. 2006).

Metoda, podle niž byla umělá inokulace provedena, patří mezi starší, dnes méně používané metody. Jako inkolum jsou používány spory mykorhizních hub, které můžeme aplikovat buď ve formě peletu nebo suspenze. Pro tuto metodu je potřebné velké množství spor. Podle Zíbara (2008) jsou na tento druh inokulace vhodnější břichatkovité než kloboukaté houby. Avšak Lu et al. (1998) úspěšně použili tento typ inokulace pro druh rodu *Laccaria*. Značnou nevýhodou tohoto typu umělé inokulace jsou její neopakovatelné výsledky, díky tomu, že je ovlivňována mnoha faktory. Mezi ovlivňující faktory patří například špatné klimatické podmínky, závlaha v lesní školce, variabilní půdní podmínky atd. Další nevýhoda spočívá ve zpožděné tvorbě mykorhiz například oproti vegetativnímu inokulu, jelikož spory potřebují čas ke klíčení (Chmelíková, Cudlín 2004).

Výběr metody byl učiněn na základě její snadné aplikace a dosažených pozitivních výsledků z blízké minulosti. U inokulovaných mladých stromů borovice lesní vodní suspenzí spor *Lactarius deliciosus* došlo k lepšímu růstu oproti neinokulovaným stromům. Po několika letech se dokonce v místě inokulace objevily plodnice inokulovaných hub *Lactarius deliciosus*. Výskyt inokulovaných ektomykorhizních hub na kořenech dřevin nebyl ovšem nijak potvrzen. (Ústní sdělení, Radek Loubal, 17. října 2014)

Podle literárních údajů by měla umělá inokulace ovlivňovat u inokulovaných semenáčků poměr mezi nadzemní a podzemní částí semenáčků, a to ve prospěch

podzemní části (Smith, Read 2008). V daném pokusu se rozdíl v poměrech mezi jednotlivými variantami neprokázal.

Jedním z faktorů, který měl zřejmě značný podíl na neúspěšnosti inokulace, je vliv počasí, zejména nedostatek srážek na jaře 2013, což mohlo vést k snížení půdní vlhkosti a inhibici růstu inokulovaných ektomykorhizních hub.

Dalším faktorem mohl být vyšší obsah živin v půdě. Obsah dusíku v půdě nebyl z technických důvodů analyzován. Hostitelská dřevina totiž nevytváří větší množství ektomykorhiz, pokud má v půdě dostatek živin (Kavková 2014).

Neúspěch byl ovlivněn i dobou aplikace umělé inokulace - rok a půl po výsevu. Na kořenech inokulovaných semenáčků již byly pravděpodobně vytvořeny ektomykorhizy hub přirozeně se vyskytujících v lesní školce, která se nachází v blízkosti lesa. Dle Chmelíkové a Cudlína (2004) by měla být půda sterilizována a vodní suspenze spor by měla být zapravena do půdy nebo substrátu před výsevem, nejpozdější však při tvorbě prvních laterárních kořenů semenáčků. Později je již rhizosféra kořenů kolonizována přirozenými ektomykorhizními houbami a ostatní půdní mikroflórou, nacházející se v lesní školce.

Určitou roli mohlo sehrát i brzké vyjmutí semenáčků z půdy ve školce (na jaře následujícího roku po podzimní inokulaci), což mohlo způsobit, že se inokulované ektomykorhizní houby nestihly uplatnit v kompetici s původními houbami v lesní školce.

I přes neúspěšnost umělé inokulace byly v jednom biometrickém parametru semenáčků zjištěny mezi variantami rozdíly. Semenáčky z kontrolní neinokulované varianty LK měly delší hlavní kořen oproti inokulovaným variantám LR a LS.

Důvodem zjištěných rozdílů může být kompetice mezi původně se vyskytujícími ektomykorhizními houbami a houbami, které byly použity k umělé inokulaci. U inokulovaných variant mohlo dojít díky inokulaci ke zpomalení růstu. Dalším důvodem mohla být i závlaha, která je dodávána pomocí postřikovače, který nemusel zavlažovat záhony rovnoměrně. Semenáčky v kontrolní variantě mohly mít také lepší půdní poměry; jejich substrát mohl být lépe promíchaný oproti substrátu inokulovanýcvh variant.

Pozitivní vliv umělé inokulace na biometrické parametry semenáčků byl potvrzen například experimentem firmy Symbiom se svým produktem Symbiom-m (obsahovala např. *Rhizopogon* sp., *Hebeloma vulutipes*, *Hebeloma* sp., *Cenococcum geophillum*). Experiment potvrdil pozitivní vliv umělé inokulace na růst, tvorbu biomasy a kolonizaci ektomykorhizních hub u sazenic buku lesního, dubu zimního, borovice lesní a smrku ztepilého. Výrazné rozdíly byly zejména zaznamenány u smrku a borovice, nižší rozdíl u

listnatých dřevin mohl být způsoben faktem, že listnaté dřeviny vytvářejí v počátečních stádiích svého vývoje nejdříve endomykorhizu a ta je až postupně nahrazována ektomykorhizou (Gajdoš 2007).

Přes neúspěch inokulace v našem pokusu, mohla inokulace nějakým způsobem ovlivnit výskyt ektomykorhizních symbiontů na semenáčcích; varianta vysvětlila 10,7 % variability ve výskytu ektomykorhizních druhů hub. Alternativním vysvětlením může být výskyt různých druhů ektomykorhizních hub, které osídlily kořenový systém semenáčků na jednotlivých záhonech. Aby se zjistilo na kolik ovlivnila nerovnoměrná závlaha, promíchanost susbtrátu či přirozeně se vyskytující ektomykorhizní houby na záhonech lesní školky výsledky umělé inokulace, muselo by být založeno více opakování pokusu. To však nebylo možné provest z důvodu provozního charakteru školkařského zařízení, ve kterém pokus probíhal.

7. ZÁVĚR

Práce se zabývá vlivem umělé inokulace na biometrické charakteristiky a výskyt ektomykorhiz na kořenovém systému semenáčků borovice lesní. Semenáčky byly pěstovány v lesní školce Svinošice na třech záhonech podle variant. Semenáčky byly inokulovány pomocí vodní suspenze, která obsahovala spóry hub. U 20 náhodně vybraných semenáčků na variantu byly měřeny biometrické charakteristiky: výška nadzemní části, délka kořenového systému, tloušťka kořenového krčku, biomasa nadzemní části a biomasa kořenového systému.

Následně bylo zjištěno zastoupení morfotypů ektomykorhizních hub na kořenovém systému těchto semenáčků. Houby tvořící jednotlivé morfotypy byly identifikovány srovnáním ITS DNA. Rozdíly mezi variantami LR, LS a LK v biometrických znacích byly zhodnoceny analýzou rozptylu (ANOVA) v programu Statistica. Vliv umělé inokulace na biometrické charakteristiky a výskyt morfotypů ektomykorhiz byl zpracován pomocí statistického programu Canoco.

Umělá inokulace byla neúspěšná, mykorhizy inokulovaných hub nebyly nalezeny. Neúspěšnost inokulace lze vysvětlit nepříznivými klimatickými podmínkami, způsobem provedení aplikace umělé inokulace nebo brzkou dobou vyjmutí semenáčku po inokulaci.

Semenáčky neinokulované varianty se lišily statisticky významným rozdílem pouze v délce hlavního kořene oproti inokulovaným variantám. To mohlo být způsobeno kompeticí mezi původními a introdukovanými ektomykorhizními houbami, lépe promíchaným půdním substrátem či lepším situováním záhonu vůči závlahovému postřikovači.

8. SUMMARY

This bachelor thesis focuses on the influence of artificial inoculation on biometric parameters and on the occurrence of ectomycorrhiza on root system of Scots pine seedlings. Seedlings were grown on three beds with three tratments in the forest nursery Svinošice. The seedlings were inoculated with a water suspension containing the fungal spores.

Twenty randomly selected seedlings per treatment were sampled; several biometric parameters were measured and the representation of morphotypes of the ectomycorrhizal fungi on their root systém was determined. Fungi forming individual morphotypes were identified by comparison of ITS DNA. Differencies between treatments LR, LS and LK in biometric parameters were evaluated by analyse of dispersion (ANOVA) in program Statistica. The influence of artificial inoculation on biometric parameters and the occurrence of ectomycorrhizal morphotypes was processed using statistical programme Canoco.

Artificial inoculation was unsuccessful, inoculated mycorrhizal fungi were not found. This failure could be attributed to unsuitable weather conditions, application method of artificial inoculation or early withdrawal of seedlings after inoculation.

Uninoculated seedling treatment had statistically significantly longer the length of the main root compared to the inoculated treatments. This could be caused due to the competition between the original and introduced ectomycorrhizal fungi, better mixed soil substrate, or better position of the bed against irrigation sprinklers.

9. SEZNAM LITERATURY

ABARENKOV, K., NILSSON, R. H., LARSSON, K. H., ALEXANDER, I. J., EBERHARDT, U., ERLAND, S., HØILAND, K., KJØLLER, R., LARSSON, E., PENNANEN, T., SEN, R., et al., 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. New Phytologist, 186: 281–285.

AGERER, R., 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelia system according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. Mycorrhiza, 11: 107–114.

AGERER, R., RAMBOLD, G. 2004-2008. DEEMY, An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae [online] citováno 22.ledna 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://deemy.de />.

ALBRECHTOVÁ, J., LATR, A., NEDOROST, L., POKLUDA, R., POSTA, K., Vosátka, M. Dual inoculation with mycorrhizal and saprotrophic fungi applicable in sustainable cultivation improves the yield and nutritive value of onion [online] citováno 21. března 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://ncbi.nlm.nih.gov>.

ALLEN, M. F., 1992. Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process. New York, Chapman a Hall, 488 s.

ANTONÍN, V., HAGARA, L., 2005. Velký atlas hub. Praha, Ottovo nakladatelství, 432 s.

CORDELL, E. CH. Mycorrhizal fungi - beneficial tools for mineland reclamation and Christmas trees [online] citováno 30. ledna 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://rngr.net>.

CUDLÍN, P., CHMELÍKOVÁ, E., 1999. Význam mykorrhizních symbióz a možnost jejich ovlivnění při pěstování stromů. In Smýkal F., Strom pro život - život pro strom, Praha. 17–20.

FITTER, A. H., NICHOLS, R., 1988. The use benomyl to control infection by vesicular-arbuscular fungi. New Phytologist, 110: 201–206.

FRANK, A. B., 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch untererdische Pilze. Bericht der Deutschen Botanischen Gesselsschaft, 3: 128–145.

GAJDOŠ, M. Vliv inokulace na růst vybraných druhů lesních dřevin [online] citováno 31. prosince 2014. Dostupné na World Wide Web: <http://symbiom.cz>.

GARNWEIDNER, E., 2002. Kapesní atlas, Houby, Praktická příručka k poznávání a určování hub ve střední Evropě. Praha, Slovart, 254 s.

GRÜNERT, H., GRÜNERTOVÁ, R., 1995. Houby. Praha, Ikar, 288 s.

GRYNDLER, M., BALÁŽ, M., HRŠELOVÁ, H., JANSA, J., VOSÁTKA, M., 2004. Mykorhizní symbióza, O soužití hub s kořeny rostlin. Praha, Academia, 366 s.

HAGARA, L., 2006. Houby atlas. Martin, Neografia, 415 s.

HARLEY, J. L., HARLEY E. L., 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. New Phytologist, 2: 1–102.

HARLEY, J. L., SMITH, S. E., 1983. Mycorrhizal Symbioses. London, Academic Press, 483 s.

CHMELÍKOVÁ, E., CUDLÍN P., 2004. Mykorhiza a její význam pro lesní dřeviny. In Seminář Kořenový systém – základ stromu, 25.8.2004, Křtiny. 37–48.

KAVKOVÁ, M., 2014. Mykorhizní symbióza. Zahradnictví, 3: 58–60.

KOLAŘÍK, J. et al., 2010. Péče o stromy rostoucí mimo les, 2.díl, Vlašim, ČSOP, 981 s.

KORKAMA, T., PAKKANEN, A., PENNANEN, T., 2006. Ectomycorrhizal community structure varies among Norway spruce (*Picea abies*) clones. New Phytologist, 171: 815–824.

KOZLOWSKI, T. T., 1971. Growth and Development of Trees. New York and London, Academic Press, 514 s.

KUYPER, T. W. Some effects of forest fertilisation on ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas: Implications for the responses to nitrogen pollution. In Person, H. (ed.) 1991. Above - and Below-ground Interactions in Forest Trees in Acidified Soil. Brussels, Comm. Eur. Communities, 66–73.

LAESSOE, T., 2004. Houby – Příroda v kostce. Praha, Knižní klub, 304 s.

LEPŠOVÁ, A. Les jako ektomykorhizní systém [online] citováno 21. března 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://silvarium.cz>.

LESY MĚSTA BRNA a.s. Lesní školka Svinošice [online] citováno 30. ledna 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://lesniskolky.cz/>.

LU, X., MALAJCZUK, N., DELL, B., 1998. Mycorrhiza formation and growth of Eucalyptus globulus seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 8: 81–86.

MASON, P. A., WILSON, J., LAST, F. T., WALKER, C., 1983. The concept of succession in relation to the spread of sheating mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings in unsterile soils. Plant Soil, 71: 247–256.

MAUER, O., PALÁTOVÁ, E., FOLTÁNEK, V., 2006. Produkce krytokořenného sadebního materiálu lesních dřevin. Kostelec nad Černými Lesy, Lesnická práce, 136 s.

MEJSTŘÍK, V., 1988. Mykorrhizní symbióza. Praha, Academia, 150 s.

MENKIS, A., VASILIAUSKAS, R., TAYLOR, A. F. S., STENLID, J., FINLAY, R., 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. Mycorrhiza, 16: 33–41.

PAULEN, O., KOBOLKA, R., 2014. Mykorhízy v záhradníctve. Zahradnictví, 8: 44–46.

PEŠKOVÁ, V., 2006. Mykoflóra kořenových systémů lesních dřevin. Disertační práce. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Lesnická a enviromentální fakulta, katedra ochrany lesa a myslivosti, 111 s.

PEŠKOVÁ, V., 2008. Houby na kořenech lesních dřevin, mykorhizy. Lesnická práce, 12: 2–4.

PEŠKOVÁ, V. Mykorhizní inokulace, cesta, jak zlepšit ujímavost sazenic [online] citováno 15. března 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://lesprace.cz>.

PEŠKOVÁ, V., SOUKUP, F., 2006. Houby vázané na kořenové systémy: Metodické přístupy ke studiu review. Zprávy lesnického výzkumu, 51/4: 279–284.

PIROZYNSKY, K. A., MALLOCH, D. W., 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. Biosystems, 6: 153–164.

PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J., et al., 1998. Fyziologie rostlin. Praha, Academia, 484 s.

REJŠEK, K., 2014. Alkalizace půdy. Zahradnictví, 2: 50–51.

ROBERT, V. et al., 2013. MycoBank gearing up for new horizons. IMA Fungus, 4/2: 371–379.

SADÍLKOVÁ, V., 2008. Vliv umělé mykorhizace na zvýšení kvality sadebního materiálu. Bakalářská práce. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta, ústav zakládání a pěstění lesa. 42 s.

SELOSSE, M. A., BOUCHARD, D., MARTIN, F., LE TACON, F., 2000. Effect of *Laccaria bicolor* strains inoculated on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) several years after nursery inoculation. Can. J. For. Re., 30: 360–371.

SCHRAMM, J. R. 1966. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pensylvania. Trans. Am. Philos. Soc. New. Ser., 56: 1–194.

SKEFFINGTON, R. A., WILSON, E. 1988. Excess of nitrogen deposition: Issues for consideration. Environ. Poll., 54: 159–184.

SMITH, S. E., READ, D. J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd edition, Elsevier, Oxford, 787 s.

Symbiom s.r.o. Inject systém [online] citováno 30. prosince 2014. Dostupné na World Wide Web: <http://symbiom.cz>.

TER BRAAK, C. J. F., ŠMILAUER, P., 1998. CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows. USA, Ithaca, Microcomputer Power, 352 s.

TESAŘOVÁ, M., STROBLOVÁ, M., 2006. Mykorhiza v zahradnické praxi. Zahradnictví, 5: 56.

TRAPPE, J. M., 1997. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Ann. Rev. Phytopathologist 15: 203–222.

VOHNÍK, M., 2008. Wood Wide Web – rostliny na síti. Živa 5: 199-201.

VOSÁTKA, M. Mykorhizní houby a jejich využití v zahradnictví [online] citováno 19. března 2015. Dostupné na World Wide Web: <http://zahradaweb.cz>.

WALKER, R. F., 1999. Reforestation of an eastern Sierra Nevada surface mine with containerized Jeffrey pine: Seedling growth and nutritional responses controlled release fertilization and ectomycorrhizal inoculation. Journal of Sustainable Forestry, 9: 127–147.

WHITE, T. J., BRUNS, T. D., LEE, S. B., TAYLOR, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, SNINSKY, J. J., WHITE, T. J., (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego, Academic Press, 315–322.

WIEMKEN, V., INEICHEN, K., BOLLER T., 2001. Development of ectomycorrhizas in model beech-spruce ecosystems on siliceous and calcareous soil: a 4-year experiment with atmospheric CO_2 enrichment and nitrogen fertilization. Plant and Soil, 234: 99–108.

ZÍBAR, T. 2008. Vliv inokulace vybraných ektomykorhizních hub na růstové charakteristiky semenáčků dubu a buku. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, 58 s.

SEZNAM OBRÁZKŮ V TEXTU

Obrázek 1: Plodnice klouzka strakoše (*Suillus variegatus*)

Obrázek 2: Plodnice klouzka obecného (*Suillus luteus*)

Obrázek 3: Plodnice ryzce pravého (*Lactarius deliciosus*)

Obrázek 4: Graf průměrných hodnot výšky nadzemní části u variant semenáčků a jejich směrodatných odchylek z Tab. 2, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 5: Graf průměrných hodnot tloušťky kořenového krčku u variant semenáčků a jejich směrodatných odchylek z Tab. 3, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 6: Graf průměrných hodnot délky hlavního kořene u variant semenáčků a jejich směrodatných odchylek z Tab. 4, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 7: Graf průměrných hodnot sušiny nadzemní části u variant semenáčků a jejich směrodatných odchylek z Tab. 5, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 8: Graf průměrných hodnot sušiny hlavního kořene u variant semenáčků a jejich směrodatných odchylek z Tab. 6, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 9: Graf průměrných hodnot sušiny vedlejších kořenů u variant semenáčků a jejich směrodatných odchylek z Tab. 7, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 10: Graf průměrných hodnot sušiny všech kořenů a jejich směrodatných odchylek z Tab. 8, znázorněné pomocí krabicového grafu

Obrázek 11: Výskyt druhů ektomykorhiz na horní části kořenového systému u varianty LK

Obrázek 12: Výskyt druhů ektomykorhiz na střední části kořenového systému u varianty LK

Obrázek 13: Výskyt druhů ektomykorhiz na dolní části kořenového systému u varianty LK

Obrázek 14: Výskyt druhů ektomykorhiz na horní části kořenového systému u varianty LR

Obrázek 15: Výskyt druhů ektomykorhiz na střední části kořenového systému u varianty LR
Obrázek 16: Výskyt druhů ektomykorhiz na dolní části kořenového systému u varianty LR
Obrázek 17: Výskyt druhů ektomykorhiz na horní části kořenového systému u varianty LS
Obrázek 18: Výskyt druhů ektomykorhiz na střední části kořenového systému u varianty LS
Obrázek 19: Výskyt druhů ektomykorhiz na dolní části kořenového systému u varianty varianty LS
Obrázek 20: Výsledky analýzy DCA, znázorňující podobnosti jednotlivých semenáčků z variant LK (černé kolečko), LS (zelený kosočtverec) a LR (fialový čtverec) z hlediska výskytu morfotypů ektomykorhiz na kořenovém systému
Obrázek 21: Výsledky analýzy CCA, vyjadřující zastoupení morfotypů v závislosti na variantě a nadzemní biomase semenáčků

SEZNAM TABULEK V TEXTU

Tabulka 1: Rozbor půdy z místa inokulace

Tabulka 2: Průměrné hodnoty variant délky nadzemní části a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 3: Průměrné hodnoty variant tloušťky kořenového krčku a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 4: Průměrné hodnoty variant délky hlavního kořene a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 5: Průměrné hodnoty variant sušiny nadzemní části a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 6: Průměrné hodnoty variant sušiny hlavního kořene a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 7: Průměrné hodnoty variant sušiny vedlejších kořenů a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 8: Průměrné hodnoty variant sušiny všech kořenů a jejich směrodatné odchylky

Tabulka 9: Morfologické znaky morfotypů u ektomykorhiz

Tabulka 10: Výsledky CCA, výskytu morfotypů na semenáčku

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Biometrické parametry semenáčků

Příloha II: Přehled vzorků zpracovaných metodou ITS rDNA

Příloha III: Výsledky porovnávání sekvencí

Příloha IV: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat výšky nadzemní části semenáčku u variant

Příloha V: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat výšky nadzemní části semenáčků u variant

Příloha VI: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u výšky nadzemní části semenáčků

Příloha VII: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat tloušťky kořenového krčku semenáčků u variant

Příloha VIII: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat tloušťky kořenového krčku semenáčků u variant

Příloha IX: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u tloušťky kořenového krčku u semenáčků

Příloha X: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat délky hlavního kořene semenáčků u variant

Příloha XI: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat délky hlavního kořene semenáčků u variant

Příloha XII: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u délky hlavního kořene u semenáčků

Příloha XIII: Výsledky Tukeyova testu z dat délky hlavního kořene semenáčků u variant

Příloha XIV: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat nadzemní sušiny semenáčků u variant

Příloha XV: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat nadzemní sušiny semenáčků u variant

Příloha XVI: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u sušiny nadzemní části

Příloha XVII: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat sušiny hlavního kořene semenáčků u variant

Příloha XVIII: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat sušiny hlavního kořene semenáčků u variant

Příloha XIX: Výsledky Welchovy analýzy rozptylu mezi variantami u sušiny hlavního kořene

Příloha XX: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat sušiny vedlejších kořenů semenáčků u variant

Příloha XXI: Výsledky Kruskal-Wallisova testu mezi variantami u sušiny vedlejších kořenů semenáčků u variant

Příloha XXII: Výsledky Shapiro-Wilkova testu z dat sušiny všech kořenů semenáčku u variant

Příloha XXIII: Výsledky Kruskal-Wallisova testu normality dat ze sušiny všech kořenů semenáčků u variant

PŘÍLOHY

Příloha I: Biometrické parametry semenáčků

číslo semenáčku	výška nadz. části (cm)	tloušťka koř. krčku (mm)	délka hl. kořene (cm)	sušina nadz. části (g)	sušina hl. kořene (g)	sušina vedlejších kořenů (g)	sušina všech kořenů (g)
LK1	21,50	6,25	28,00	5,556	1,896	0,674	2,57
LK2	17,00	4,36	28,00	6,657	1,022	0,248	1,27
LK3	26,50	6,09	39,50	7,156	0,851	0,632	1,483
LK4	21,00	4,26	33,50	3,101	0,713	0,03	0,743
LK5	37,00	8,26	27,50	14,181	3,814	1,16	4,974
LK6	25,50	5,07	34,00	5,925	1,243	0,307	1,55
LK7	23,50	4,42	25,00	6,148	0,864	0,158	1,022
LK8	35,00	8,04	30,00	15,087	2,834	2,121	4,955
LK9	24,00	5,06	37,00	8,98	1,899	0,602	2,501
LK10	15,00	3,22	24,00	3,161	0,382	0,038	0,42
LK11	33,00	7,45	33,50	14,29	3,372	1,561	4,933
LK12	28,00	6,30	38,00	10,761	1,63	0,475	2,105
LK13	33,50	9,00	34,00	16,525	3,168	2,295	5,463
LK14	22,50	3,01	27,50	3,001	0	0,396	0,396
LK15	21,50	3,05	25,50	3,189	0,498	0	0,498
LK16	19,00	3,00	30,00	2,561	0,244	0,194	0,438
LK17	22,00	4,50	45,00	4,283	0,883	0,14	1,023
LK18	32,50	7,40	31,00	5,385	0,653	0,265	0,918
LK19	21,00	4,00	24,00	18,259	2,422	1,17	3,592
LK20	30,00	5,20	28,00	7,891	1,126	0,397	1,523
LR1	26,50	5,32	25,00	7,339	0,768	0,167	0,935
LR2	28,00	6,25	30,50	7,948	0,846	0,899	1,745
LR3	22,00	4,30	26,50	4,753	0,696	0,268	0,964
LR4	29,00	5,49	22,00	12,852	1,392	0,624	2,016
LR5	19,00	3,41	24,00	2,581	0,215	0,014	0,229
LR6	29,00	7,39	31,50	13,797	1,644	0,993	2,637
LR7	22,50	4,41	22,00	3,437	0,362	0,127	0,489
LR8	19,50	5,39	23,50	15,365	1,107	0,845	1,952
LR9	24,00	5,12	16,50	7,987	0,567	0,25	0,817
LR10	23,00	5,24	22,00	11,03	0,791	0,676	1,467
LR11	16,00	2,04	21,50	1,837	0,146	0,043	0,189
LR12	22,00	3,14	17,50	2,849	0,217	0,072	0,289
LR13	31,50	6,00	36,50	9,334	1,175	0,926	2,101
LR14	20,00	2,20	22,00	1,601	0,121	0,008	0,129
LR15	20,50	4,25	16,50	5,367	0,52	0,349	0,869
LR16	27,50	4,10	26,00	4,86	0,435	0,145	0,58

číslo semenáčku	výška nadz. části (cm)	tloušťka koř. krčku (mm)	délka hl. kořene (cm)	sušina nadz. části (g)	sušina hl. kořene (g)	sušina vedlejších kořenů (g)	sušina všech kořenů (g)
LR17	30,00	6,05	25,00	10,19	1,588	0,37	1,958
LR18	33,00	8,16	25,50	17,515	1,656	1,941	3,597
LR19	19,50	4,10	31,00	9,142	0,634	0,232	0,866
LR20	18,00	5,00	34,50	10,126	0,818	0,253	1,071
LS1	29,50	6,13	29,00	10,379	1,914	0,326	2,24
LS2	25,00	6,33	24,50	10,19	1,362	0,187	1,549
LS3	30,00	6,17	30,50	9,561	1,605	0,46	2,065
LS4	34,50	8,15	23,50	16,692	2,039	0,63	2,669
LS5	26,00	4,05	25,00	5,37	0,591	0,053	0,644
LS6	24,00	7,35	32,50	20,431	2,105	1,901	4,006
LS7	19,00	7,12	28,50	13,548	1,863	0,766	2,629
LS8	25,50	7,10	29,50	7,552	1,127	0,642	1,769
LS9	24,00	2,05	19,50	1,117	0,128	0	0,128
LS10	15,50	3,40	22,00	2,597	0,327	0,041	0,368
LS11	21,00	4,50	26,00	4,2	0,784	0,18	0,964
LS12	32,00	6,00	21,00	6,565	0,908	0,157	1,065
LS13	35,00	5,10	25,00	7,436	0,73	0,66	1,39
LS14	27,50	5,00	29,50	5,057	0,66	0,23	0,89
LS15	29,00	4,10	25,50	5,242	0,902	0,068	0,97
LS16	37,50	6,36	25,50	11,016	0,88	0,186	1,066
LS17	35,00	5,15	31,00	7,222	0,773	0,14	0,913
LS18	28,50	4,00	30,00	4,439	0,429	0,171	0,6
LS19	19,50	3,10	23,00	2,915	0,171	0,004	0,175
LS20	17,00	2,43	30,50	1,305	0,156	0	0,156

Příloha II: Přehled vzorků zpracovaných metodou ITS rDNA

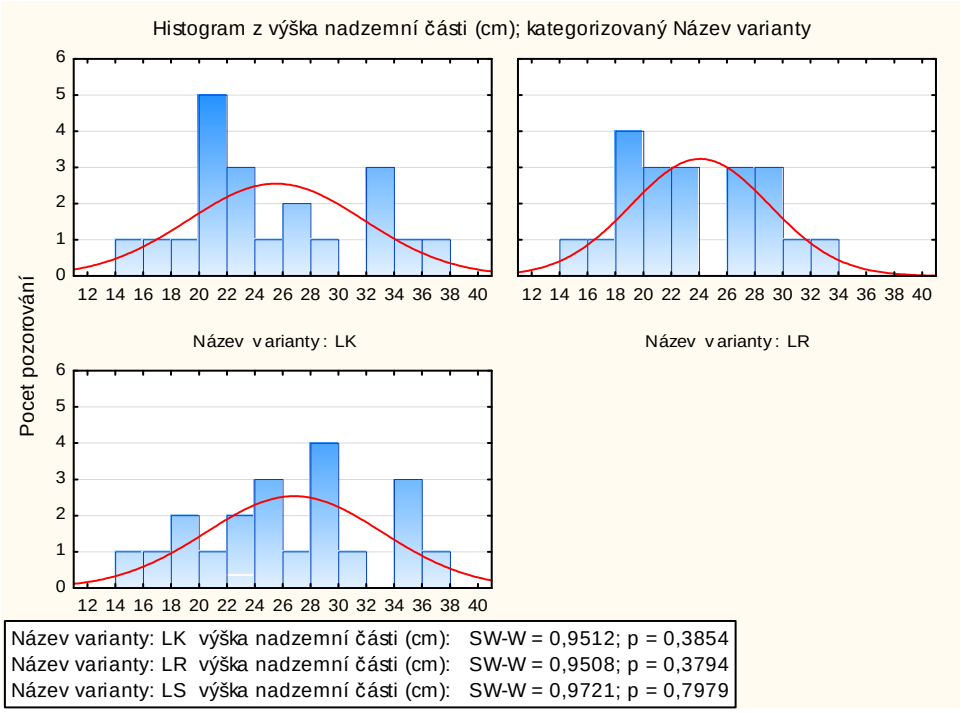
varianta pokusu	číslo sazenice	název vzorku	datum izolace DNA	datum PCR	výsledek amplifikace	datum sekvenace	odhadnutá koncentrace DNA	odhadnutá délka fragmentu
květen 2013								
LR	**4**	**LR4_29**	**10.5.2013**	**10.5.2013**	**dobrá**	**10.5.2013**	**15**	**800**
LS	**2**	**LS2_37**	**10.5.2013**	**10.5.2013**	**dobrá**	**10.5.2013**	**25**	**800**
LR	**1**	**LR1_48**	**10.5.2013**	**10.5.2013**	**dobrá**	**10.5.2013**	**20**	**800**
LS	**13**	**LS13_96**	**10.5.2013**	**10.5.2013**	**slabá**	**10.5.2013**	**10**	**650**
LS	**20**	**LS20_111**	**10.5.2013**	**10.5.2013**	**slabá**	**10.5.2013**	**20**	**850**
LR	**16**	**LR16_189**	**10.5.2013**	**10.5.2013**	**slabá**	**10.5.2013**	**10**	**850**
LR	2	LR2_22	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LR	5	LR5_31	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LR	3	LR3_55	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LR	3	LR3_56	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LS	1	LS1_57	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LK	7	LK7_66	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LK	7	LK7_67	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LK	11	LK11_83	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LR	11	LR11_88	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LR	**14**	**LR14_91**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**25**	**800**
LS	**15**	**LS15_99**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**15**	**800**
LS	17	LS17_176	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LS	**12**	**LS12_186**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**20**	**750**
LR	2	LR2_22	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LR	**5**	**LR5_31**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**10**	**650**
LR	**3**	**LR3_55**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**15**	**800**
LR	**3**	**LR3_56**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**10**	**800**
LS	**1**	**LS1_57**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**dva produkty**	**11.5.2013**	**10**	**800**
LK	7	LK7_66	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LK	7	LK7_67	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LK	**11**	**LK11_83**	**11.5.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**11.5.2013**	**10**	**850**
LR	11	LR11_88	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LS	17	LS17_176	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LS	7	LS7_197	11.5.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
červenec 2013								
LK	**1**	**LK1_4**	**14.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**40**	**750**
LK	3	LK3_12	14.7.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LK	10	LK10_45	14.7.2013	11.5.2013	slabá, dva produkty	-	-	-
LK	**13**	**LK13_85**	**14.7.2013**	**11.5.2013**	**dva produkty**	**15.7.2013**	**25**	**750**
LK	17	LK17_182	14.7.2013	11.5.2013	slabá, dva produkty	-	-	-
LK	**5**	**LK5_17**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**15.7.2013**	**10**	**700**
LK	**5**	**LK5_20**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**15**	**750**
LK	10	LK10_46	15.7.2013	11.5.2013	dva produkty	-	-	-
LK	**16**	**LK16_183**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**20**	**750**
LS	2	LS2_35	15.7.2013	11.5.2013	nepodařilo se vyizolovat DNA	-	-	-
LS	**13**	**LS13_97**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**15**	**750**
LS	**16**	**LS16_108**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**15.7.2013**	**10**	**700**
LS	**9**	**LS9_194**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**slabá**	**15.7.2013**	**10**	**900**

varianta pokusu	číslo sazenice	název vzorku	datum izolace DNA	datum PCR	výsledek amplifikace	datum sekvenace	odhadnutá koncentrace DNA	odhadnutá délka fragmentu
LR	**2**	**LR2_23**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**20**	**700**
LR	**1**	**LR1_50**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**15**	**700**
LR	19	LR19_105	15.7.2013	11.5.2013	dobrá	-	-	-
LR	19	LR19_106	15.7.2013	11.5.2013	dva produkty	-	-	-
LK	4	LK4_14	15.7.2013	11.5.2013	dobrá	-	-	-
LK	**4**	**LK4_14**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**10**	**800**
LK	18	LK18_102	15.7.2013	11.5.2013	dva produkty	-	-	-
LR	**4**	**LR4_30**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**10**	**850**
LR	6	LR6_71	15.7.2013	11.5.2013	dva produkty	-	-	-
LR	**13**	**LR13_188**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dva produkty**	**15.7.2013**	**25**	**850**
LR	**7**	**LR7_198**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dva produkty**	**-**	**-**	**-**
LS	**18**	**LS18_109**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**15**	**750**
LK	**8**	**LK8_43**	**15.7.2013**	**11.5.2013**	**dobrá**	**15.7.2013**	**20**	**700**
červenec 2014								
LK	**19**	**LK19_180**	**srpen**	**srpen**	**dobrá**	**srpen**	**30**	**800**
LR	**1**	**LR1_47**	**srpen**	**srpen**	**dobrá**	**srpen**	**10**	**900**
LS	**7**	**LS7_196**	**srpen**	**srpen**	**dobrá**	**srpen**	**20**	**700**
LS	**8**	**LS8_81**	**srpen**	**srpen**	**dobrá**	**srpen**	**10**	**700**
LS	**11**	**LS11_94**	**srpen**	**srpen**	**dobrá**	**srpen**	**15**	**700**
LS	**14**	**LS14_185**	**srpen**	**srpen**	**dobrá**	**srpen**	**20**	**700**

Příloha III: Výsledky porovnávání sekvencí

číslo semenáčku	délka	název	číslo sekvence	E-value	identita
LK 04	591	*Rhizopogon roseolus*	EU784401.1	0	99%
LK 14	608	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742745.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	99%,
LK 17	592	*Wilcoxina mikolae*	AY880942.1	0	99%
LK 183	641	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742745.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	99%, (
LK 20	645	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742744.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	99%,
LK 43	586	*Wilcoxina mikolae*	GQ267499.1	0	98%
LK 85	646	*Rhizopogon roseolus*	EU784401.1	0	99%
LR 188	712	*Rhizopogon roseolus*	KF990475.1	0	99%
LR 23	635	*Pezizaceae* sp., *(Peziza ostracoderma)*	JN102407.1, (EU819461.1)	0.0, (0.0)	99%,
LR 30	642	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742744.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	99%,
LR50	-	směs více produktů	-	-	-
LS 108	-	směs více produktů	-	-	-
LS 109	638	*Pezizaceae* sp., *(Peziza ostracoderma)*	JN102407.1, (EU819461.1)	0.0, (0.0)	99%,
LS 194	807	*Meliniomyces* sp., *(Meliniomyces bicolor)*	KC007335.1, (AY394885.1)	0:0, (0.0)	98%,
LS 97	638	*Pezizaceae* sp., *(Peziza ostracoderma)*	JN102407.1, (EU819461.1)	0.0, (0.0)	99%,
LK83	719	*Rhizopogon rubescens*	JX907816.1	0	99%
LR 189	715	*Rhizopogon rubescens*	JX907816.1	0	99%
LR 29	663	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742744.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	99%,
LR 31	573	*Meliniomyces* sp., *(Meliniomyces bicolor)*	KC007335.1,	0.0, (0.0)	97%,
LR 48	665	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742745.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	94%,
LR 55	648	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742744.1,	0.0, (0.0)	99%,
LR 56	691	*Hebeloma cavipes*	EU570163.1	$6E^{-156}$	82%
LR 57	-	málo DNA	-	-	-
LR 91	735	*Rhizopogon roseolus*	HM036649.1	0	99%
LS 111	720	*Rhizopogon rubescens*	JX907816.1	0	100%
LS 189	648	*Pezizaceae* sp., *(Peziza ostracoderma)*	JN102407.1, (EU819461.1)	0.0, (0.0)	99%,
LS 37	647	*Pezizaceae* sp., *(Peziza ostracoderma)*	JN102407.1, (EU819461.1)	0.0, (0.0)	99%,
LS 96	198	nekvalitní sekvence	-	-	-
LS 99	718	*Rhizopogon rubescens*	JX907816.1	0	98%
LK 180	738	*Rhizopogon rubescens, (Rhizopogon*	JX907816., (AM084707.1)	0.0, (0.0)	99%,
LR 47	924	*Meliniomyces* sp., *(Meliniomyces bicolor)*	KC007335.1, (AY394885.1)	0.0, (0.0)	98%,
LS 81	687	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742744.1, (KC152263.1)	0.0, (0.0)	99%,
LS 94	665	*Pezizaceae* sp., *(Peziza ostracoderma)*	JN102407.1, (EU819461.1)	0.0,(0.0)	98%,
LS 185	751	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742730.1, (HM485387.1)	0.0, (0.0)	98%,
LS 196	1191	*Tuber* sp., *(Tuber separans)*	KF742744.1, (KC152263.1)	0.0, (0.0)	99%,

Příloha IV: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat výšky nadzemní části semenáčku u variant



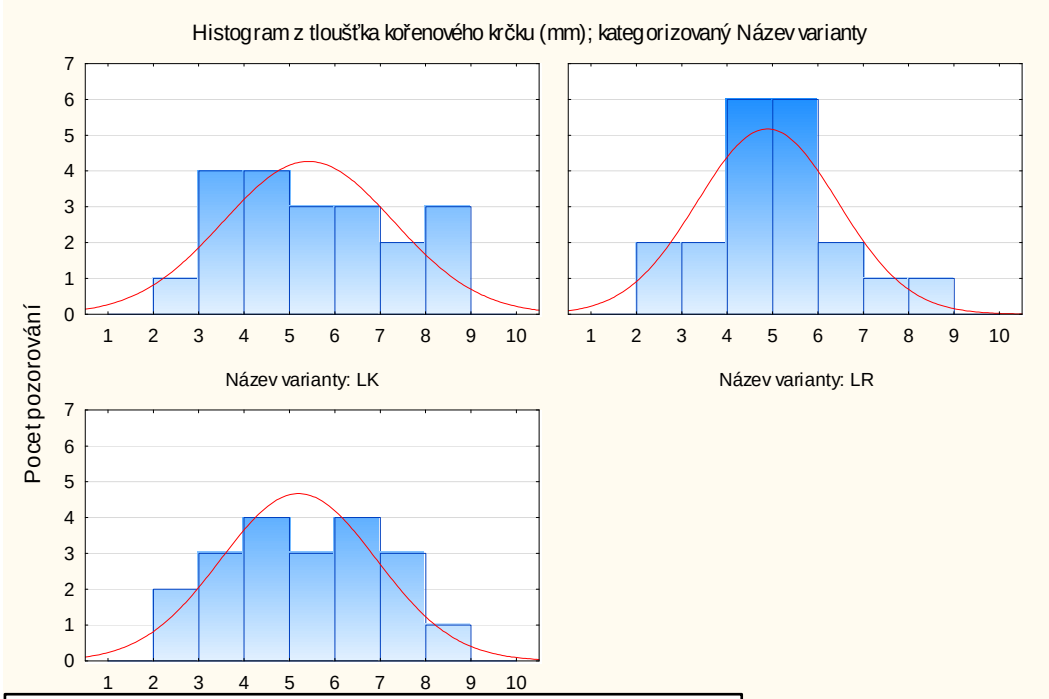
Příloha V: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat výšky nadzemní části semenáčků u variant

Proměnná	Leveneův test homogenity rozpylů Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 F	p
výška nadzemní části (cm)	0,594263	0,555352

Příloha VI: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u výšky nadzemní části semenáčků

Proměnná	Analýza rozptylu Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 F	p
výška nadzemní části (cm)	1,080263	0,346354

Příloha VII: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat tloušťky kořenového krčku semenáčků u variant



Název varianty: LK tloušťka kořenového krčku (mm): SW-W = 0,9328; p = 0,1750
Název varianty: LR tloušťka kořenového krčku (mm): SW-W = 0,9766; p = 0,8826
Název varianty: LS tloušťka kořenového krčku (mm): SW-W = 0,972; p = 0,7959

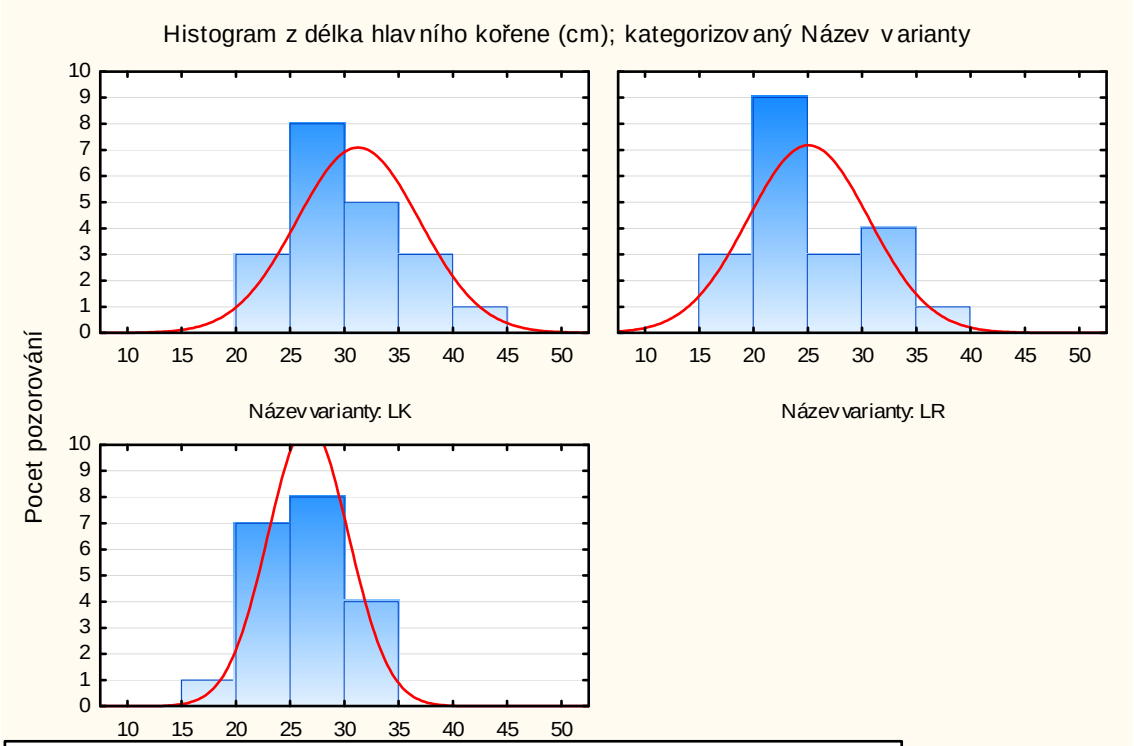
Příloha VIII: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat tloušťky kořenového krčku semenáčků u variant

Proměnná	Leveneův test homogenity rozpylů Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000	
	F	p
tloušťka kořenového krčku (mm)	0,804932	0,452135

Příloha IX: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u tloušťky kořenového krčku u semenáčků

Proměnná	Analýza rozptylu Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000	
	F	p
tloušťka kořenového krčku (mm)	0,482381	0,619809

Příloha X: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat délky hlavního kořene semenáčků u variant



Název varianty: LK	délka hlavního kořene (cm):	SW-W = 0,9336; p = 0,1811
Název varianty: LR	délka hlavního kořene (cm):	SW-W = 0,948; p = 0,3376
Název varianty: LS	délka hlavního kořene (cm):	SW-W = 0,9532; p = 0,4175

Příloha XI: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat hlavního kořene semenáčků u variant

Proměnná	Leveneův test homogenity rozpylů Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000	
	F	p
délka hlavního kořene (cm)	1,190893	0,311398

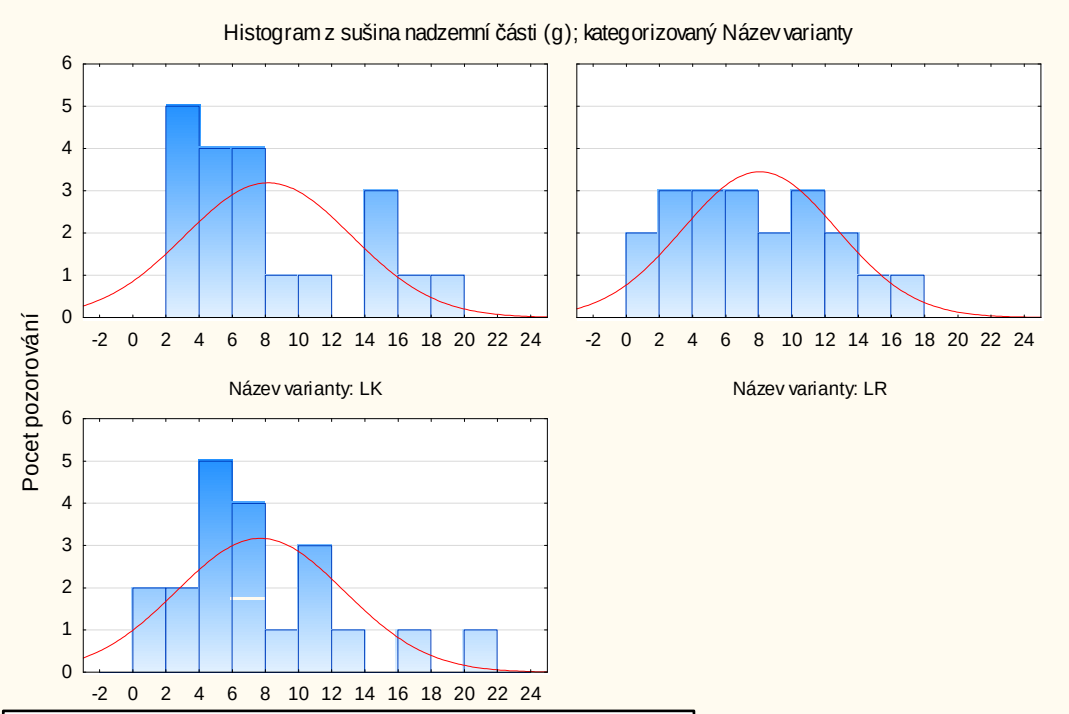
Příloha XII: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u délky hlavního kořene u semenáčků

Proměnná	Analýza rozptylu Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000	
	F	p
délka hlavního kořene (cm)	8,086080	0,000810

Příloha XIII: Výsledky Tukeyova testu z dat délky hlavního kořene semenáčků u variant

Název varianty		Tukeyův HSD test; proměn.:délka hlavního kořene (cm) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000 {1} M=31,150	{2} M=24,975	{3} M=26,575
LK	{1}		0,000907	0,015710
LR	{2}	0,000907		0,577547
LS	{3}	0,015710	0,577547	

Příloha XIV: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat nadzemní sušiny semenáčku u variant



Název varianty: LK	sušina nadzemní části (g): SW-W = 0,8801; p = 0,0178
Název varianty: LR	sušina nadzemní části (g): SW-W = 0,9574; p = 0,4924
Název varianty: LS	sušina nadzemní části (g): SW-W = 0,9264; p = 0,1314

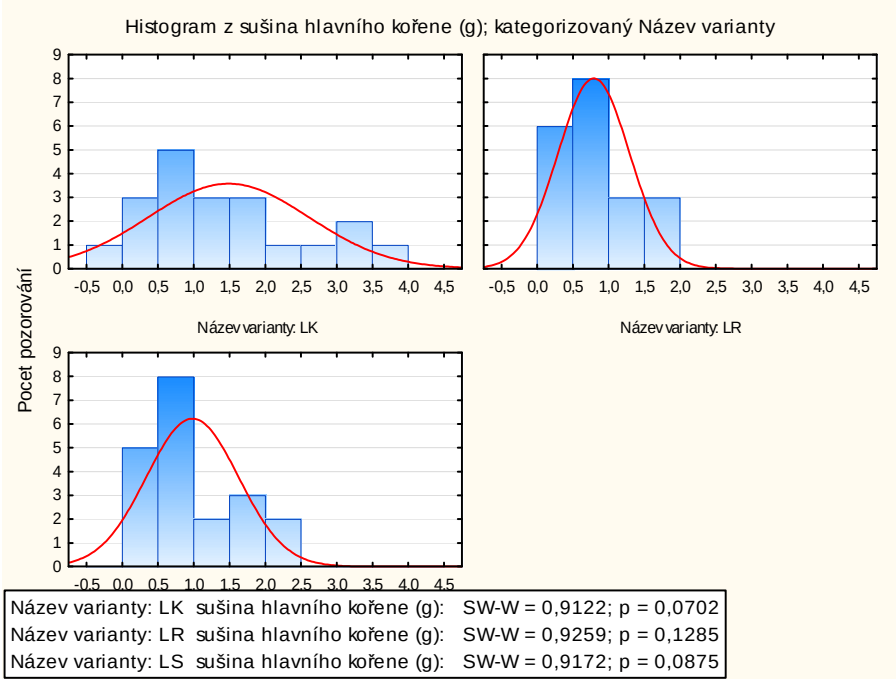
Příloha XV: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat nadzemní sušiny semenáčků u variant

Proměnná	Leveneův test homogenity rozpylů Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 F	p
sušina nadzemní části (g)	0,108680	0,897203

Příloha XVI: Výsledky analýzy rozptylu mezi variantami u sušiny nadzemní části

Proměnná	Analýza rozptylu Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 F	p
sušina nadzemní části (g)	0,048973	0,952247

Příloha XVII: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat sušiny hlavního kořene semenáčků u variant



Název varianty: LK sušina hlavního kořene (g): SW-W = 0,9122; p = 0,0702
Název varianty: LR sušina hlavního kořene (g): SW-W = 0,9259; p = 0,1285
Název varianty: LS sušina hlavního kořene (g): SW-W = 0,9172; p = 0,0875

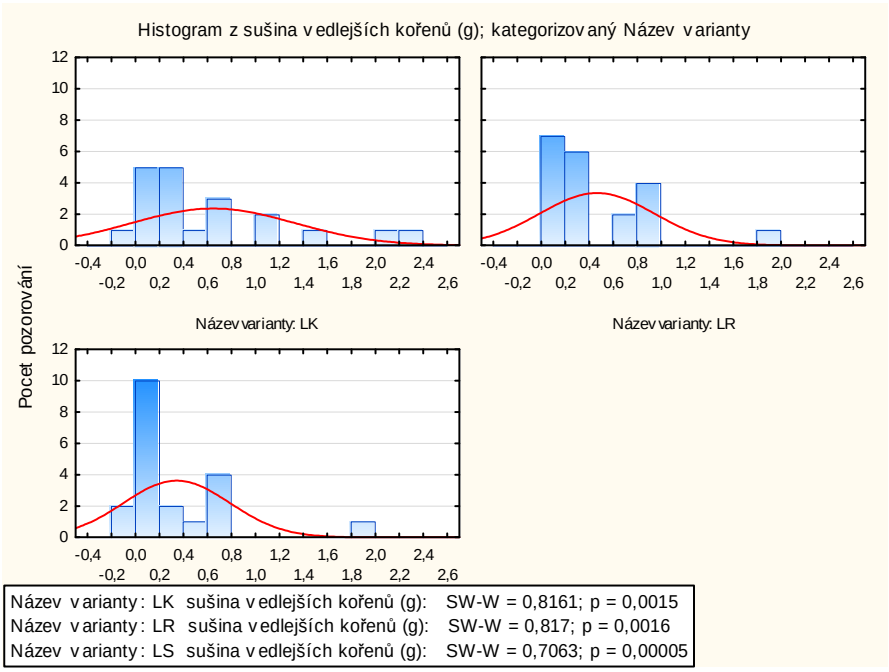
Příloha XVIII: Výsledky Levenova testu homogenity rozptylů z dat sušiny hlavního kořene semenáčků u variant

Proměnná	Leveneův test homogenity rozpylů Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 F	p
sušina hlavního kořene (g)	8,180680	0,000753

Příloha XIX: Výsledky Welchovy analýzy rozptylu mezi variantami u sušiny hlavního kořene

Proměnná	Analýza rozptylu Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 Welch. F	Welch. p
sušina hlavního kořene (g)	3,221532	0,051840

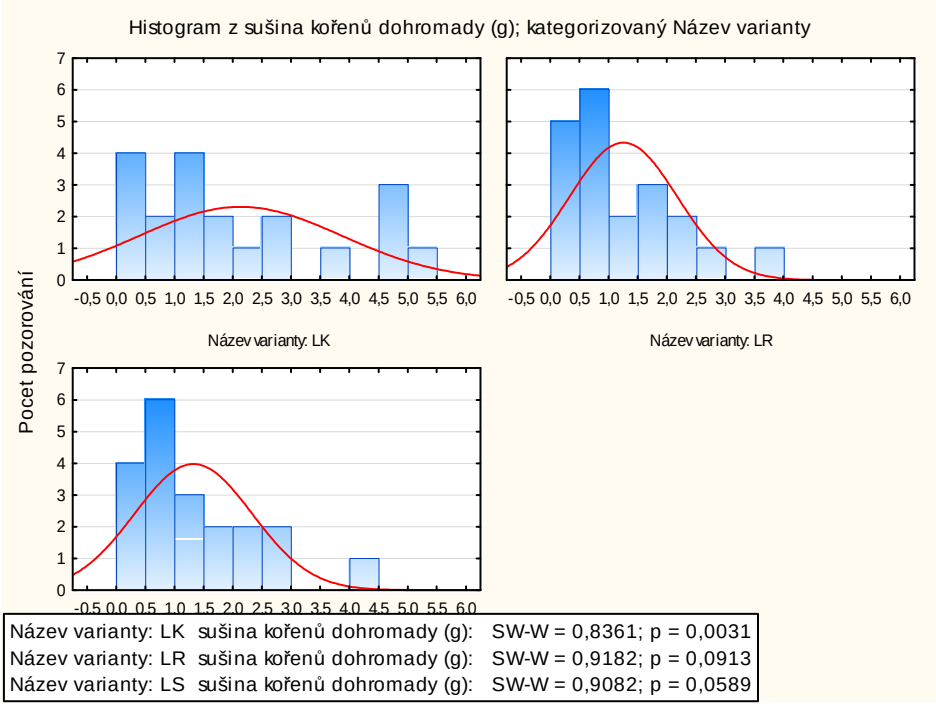
Příloha XX: Výsledky Shapiro-Wilkova testu normality z dat sušiny vedlejších kořenů semenáčků u variant



Příloha XXI: Výsledky Kruskal-Wallisova testu mezi variantami u sušiny vedlejších kořenů semenáčků u variant

Závislá: sušina vedlejších kořenů (g)	Kruskal-Wallisova ANOVA založ. na poř.; sušina vedlejších kořenů (g) Nezávislá (grupovací) proměnná : Název varianty **Kruskal-Wallisův test**: H (2, N= 60) =3,261191 **p =,1958**		
	Počet platných	Součet pořadí	Prům. Pořadí
LK	20	699,5000	34,97500
LR	20	628,0000	31,40000
LS	20	502,5000	25,12500

Příloha XXII: Výsledky Shapiro-Wilkova testu z dat sušiny všech kořenů u variant



Příloha XXIII: Výsledky Kruskal-Wallisova testu normality dat z sušiny všech kořenů semenáčků u variant

Závislá: sušina kořenů dohromady (g)	Kruskal-Wallisova ANOVA založ. na poř.; sušina kořenů dohromady (g) Nezávislá (grupovací) proměnná : Název varianty **Kruskal-Wallisův test**: H (2, N= 60) =2,985903 **p =,2247**		
	Počet platných	Součet pořadí	Prům. Pořadí
LK	20	719,0000	35,95000
LR	20	541,5000	27,07500
LS	20	569,5000	28,47500