

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Vliv dostupnosti živin na mykorhizní symbiózu lučních rostlin

Bakalářská práce

Tereza Pecková

Školitelka: doc. RNDr. Marie Šmilauerová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Pecková, T., 2023: Vliv dostupnosti živin na mykorhizní symbiózu lučních rostlin [Influence of nutrient availability on mycorrhizal symbiosis of grassland plants, Bc. Thesis, in Czech] – 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Arbuscular mycorrhizal symbiosis occurs in most of the vascular plants. One of the factors influencing expression of a symbiosis is the availability of nutrients in soil. This thesis explores how different levels of phosphorus and nitrogen affect the colonisation and community of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and fine root endophytes (FE) in monocotyledonous and dicotyledonous plants. Increased phosphorus availability resulted in lower AMF and FE colonisation, especially in monocotyledonous plants. Nitrogen addition to soil resulted in greater FE colonisation and dominance of a single taxon in the AMF community. The lowest levels of colonisation and the greatest taxonomic diversity were found in plants fertilised with both nutrients.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 7. 12. 2023

.....

Tereza Pecková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat Majce Šmilauerové za její trpělivé vedení a pomoc se všemi náležitostmi, jež má práce obnášela. Ať už se jednalo o pomoc se zakládáním i ukončováním pokusu, zpracováváním vzorků či samotným psaním této práce. Mé díky patří i Petrovi Šmilauerovi za asistenci se statistickým vyhodnocením a s úpravami textu. Za odborné vedení a pomoc v molekulární laboratoři bych chtěla poděkovat Jirkovi Košnarovi a Evě Holé. Velké díky náleží i Blance Divišové a Sylvě Pecháčkové za jejich pomoc při zpracování vzorků. Evče a Honzovi bych chtěla projevit vděčnost za jejich psychickou podporu a péči nejen o mé stravovací návyky. Na závěr bych chtěla poděkovat své drahé rodině za nezanedbatelnou podporu ať už tu duševní či materiální.

Financování:

Tato práce byla částečně financována Studentskou grantovou agenturou Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity.

Použité zkratky:

| | |
|------|--|
| AM | ... arbuskulární mykorhizní symbióza |
| AMF | ... arbuscular mycorrhizal fungi (arbuskulárně mykorhizní houby) |
| AO | ... <i>Anthoxanthum odoratum</i> |
| BO | ... <i>Betonica officinalis</i> |
| CBE | ... Chlorazol black E |
| CTAB | ... cetyltrimethylammonium bromid |
| FE | ... fine root endophytes |
| NGS | ... next generation sequencing (sekvenování nové generace) |
| OTU | ... operational taxonomic units |
| PA | ... <i>Poa angustifolia</i> |
| PCR | ... polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce) |
| PL | ... <i>Plantago lanceolata</i> |
| RDA | ... redundanční analýza |
| VTX | ... virtuální taxon |

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 1.1 | Arbuskulární mykorhizní symbióza..... | 1 |
| 1.2 | Mechanismy symbiózy | 2 |
| 1.3 | Popisné metody studia společenstev AMF a FE..... | 3 |
| 1.3.1 | Mikroskopické vyhodnocení kolonizace kořenů AMF a FE..... | 3 |
| 1.3.2 | Molekulární metody | 4 |
| 1.4 | Vliv živin v půdě na AM | 5 |
| 1.5 | Vliv hostitelské rostliny na AM..... | 8 |
| 2 | Cíle a hypotézy práce | 10 |
| 3 | Metodika..... | 11 |
| 3.1 | Skleníkový pokus..... | 11 |
| 3.1.1 | Zvíkov – zdrojová lokalita..... | 11 |
| 3.1.2 | Založení pokusu..... | 11 |
| 3.1.3 | Hnojení | 12 |
| 3.1.3 | Zkušební květináče | 13 |
| 3.1.4 | Ukončení pokusu, zpracování biomasy | 13 |
| 3.2 | Odhad intenzity kolonizace kořenů AMF..... | 13 |
| 3.2.1 | Barvení AMF v kořenech rostlin..... | 13 |
| 3.2.1.1 | Volba parametrů barvení..... | 13 |
| 3.2.1.2 | Použitý protokol barvení | 14 |
| 3.2.2 | Příprava preparátů..... | 14 |
| 3.2.3 | Vyhodnocování kolonizace | 15 |
| 3.2.4 | Zpracování dat | 16 |
| 3.3 | Stanovení společenstva AMF a FE v kořenech pokusných rostlin..... | 17 |
| 3.3.1 | Příprava kořenů | 17 |
| 3.3.2 | Izolace DNA – CTAB protokol..... | 17 |
| 3.3.3 | PCR..... | 18 |
| 3.3.5 | Stanovení koncentrace DNA | 19 |
| 3.3.6 | Příprava vzorků pro sekvenování DNA..... | 19 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.7 | Zpracování NGS dat | 20 |
| 3.3.7.1 | Identifikace AMF | 20 |
| 3.3.7.2 | Identifikace FE | 20 |
| 3.3.7.3 | Zpracování finálního souboru dat | 21 |
| 3.3.7.4 | Statistické vyhodnocení..... | 21 |
| 3.4 | Chemická analýza | 22 |
| 3.4.1 | Příprava biomasy | 22 |
| 3.4.2 | Analýza fosforu (FIA) | 22 |
| 3.4.3 | Analýza dusíku a uhlíku (TCD) | 22 |
| 4 | Výsledky..... | 23 |
| 4.1 | Hostitelské rostliny | 23 |
| 4.2 | Chemické analýzy | 25 |
| 4.3 | Intenzita kolonizace kořenů AMF a FE | 27 |
| 4.3.1 | Celková kolonizace AM | 28 |
| 4.3.2 | Arbuskulární kolonizace..... | 29 |
| 4.3.3 | Vezikulární kolonizace | 29 |
| 4.3.4 | Kolonizace FE | 30 |
| 4.4 | Složení a diverzita společenstev zkoumaných hub | 31 |
| 4.4.1 | Společenstva AM hub..... | 31 |
| 4.4.1 | Diverzita společenstva | 35 |
| 4.4.2 | Společenstva FE | 36 |
| 4.5 | Porovnání intenzity kolonizace kořenů a složení společenstva | 37 |
| 5 | Diskuse | 38 |
| 6 | Závěr..... | 42 |
| 7 | Literatura | 43 |
| 8 | Přílohy | 48 |

1 Úvod

1.1 Arbuskulární mykorhizní symbióza

Mykorhizní symbióza je soužití houby a rostliny. Při tomto typu interakce pronikají hyfy do rhizodermis nebo mezi či přímo do buněk primární kůry kořene. Zde pak dochází k oboustranné výměně živin, hormonů a dalších látek (Delevaux et al. 2017).

Nějakou formu mykorhizní symbiózy lze nalézt u většiny cévnatých rostlin. Nejčastější typ, arbuskulární mykorhizní symbiózu (AM), vytváří asi 74 % druhů (van der Heijden et al. 2018). Žádná AM se nevyskytuje většinou u rostlin parazitických či poloparazitických, vodních, rostlin v symbióze s jinými organismy atd. (Brundrett 2017).

AM je typická tím, že houba vytváří v buňkách primární kůry bohatě větvené útvary arbuskuly, podle kterých dostala své jméno. Houbová hyfa přitom proniká buněčnou stěnou, avšak ne cytoplazmatickou membránou buněk hostitele. Mezi tzv. periarbuskulární membránou rostliny a vrostlou hyfou vzniká prostor, kde dochází k intenzivní komunikaci a přenosu látek (Dickson et al. 2007). Další strukturou, kterou již nevytváří všechny arbuskulárně mykorhizní houby (AMF), jsou vezikuly. Jedná se o váčkovité útvary, které fungují jako zásobárna lipidů (van Aarle & Olsson 2003). Cenocytické mycelium, tedy nepřehrádkované mycelium s větším počtem jader, přijímá sloučeniny uhlíku výhradně z kořenů hostitelských rostlin.

Velká vnitrodruhová diverzita napovídá tomu, že by tyto houby měly být schopny pohlavního rozmnožování. Způsob, jakým by mohlo k rekombinaci docházet však není doložen (Vandenkoornhuysen et al. 2001). Tyto houby vytvářejí dva druhy spor – azygospory a chlamydospory (Goto & Maia 2006). Ač princip vzniku spor je odlišný, v obou případech se jedná o vegetativní rozmnožování (Vandenkoornhuysen et al. 2001). Tyto částice se pak šíří větrem, pomocí bezobratlých živočichů či malých savců.

Spory za příznivých ekologických podmínek vyklíčí v hyfy. Další možností je rozrůstání hyf ze segmentů již infikovaných kořenů (Boeraeve et al. 2019). V obou případech hyfy reagují na strigolaktiny, jež hostitelské rostliny vypouští do půdy. Pomocí nich najdou kořen, do kterého následně vrostou. Pokud rostlina trpí nedostatkem živin, vypustí těchto hormonů do svého okolí více (López-Ráez et al. 2011). Na dalším utváření a regulaci symbiózy se podílí látky a procesy podobné těm, které zajišťují obranu proti patogenům. Rostlina například produkuje etylen, kyselinu salicylovou, kyselinu abscisovou a jasmonáty (López-Ráez et al. 2011).

Systematicky jsou houby tvořící AM řazeny do kmene Mucoromycota. Konkrétně AMF patří do podkmene Glomeromycotina. Do nedávna sem byly řazeny i drobnější houby vytvářející podobné struktury – fine root endophytes (FE). Orchard et al. (2017) je ale překlasifikovali do podkmene Mucoromycotina. Zatímco existují různé metody identifikace hub z podkmene Glomeromycotina, možnosti pro podkmen Mucoromycotina jsou značně omezené. Na rozdíl od popsanych a rozeznatelných spor AMF jsou spory FE malé a je těžké je izolovat. Kultivace FE je také obtížná – zatím se povedlo vytvořit jedinou čistou kulturu (Sinataj et al. 2021).

1.2 Mechanismy symbiomy

AM je důležitá mimo jiné z evolučního pohledu na vývoj rostlin. Symbiomy s houbami z podkmene Glomeromycotina nejspíše umožnila přechod rostlin na souš (Field & Pressel 2018). Toto tvrzení podporuje výskyt AM i v raně odvozených skupinách, jako jsou játrovky a kaprad'orosty. Druhým důkazem je datování vzniku podkmene Glomeromycotina do doby terestrializace, tedy období rozvoje suchozemských rostlin (Field & Pressel 2018).

Rostliny předají houbě přibližně 10–20 % (někdy až 50 %) produktů fotosyntézy (Field & Pressel 2018). Recipročně AMF poskytují výhody pro rostlinu zejména z hlediska výživy, a to například prostřednictvím dodávání nemobilních živin, jako je fosfor (Unger et al. 2016). Houby odvedou do kořenů hostitelských rostlin až 80 % přijatého fosforu (Field & Pressel 2018).

Mykorhizní houby získávají pomocí mimokořenových hyf anorganický fosfát z půdy, přeměňují ho na polyfosfát a vakuoly ho přenášejí do hyf v kořenech. Tam je polyfosfát hydrolyzován a přenášen do rostliny prostřednictvím periarbuskulární membrány arbuskul (Ezawa 2002). Dusík AMF vstřebávají ve formě dusičnanů, amonného dusíku nebo aminokyselin. Hyfou je pak transportován jako arginin po koncentračním gradiendu. Nakonec je rostlinným buňkám předán ve formě amoniaku (Jach-Smith & Jackson 2020).

Na oplátku rostlina houbě dává své asimiláty. Předpokládá se, že tento přenos probíhá přes membránu arbuskuly. Přesný mechanismus však ještě nebyl dokázán. Možností je, že uhlík je přenášen ve formě mastných kyselin či hexóz za pomoci aktivního přenašeče (Field & Pressel 2018).

Zatímco houby z podkmene Glomeromycotina jsou obligátní biotrofové, do podkmene Mucoromycotina patří fakultativní saprotrofové. Jsou tedy schopny získat uhlík i dusík z organických zdrojů. Tato skupina symbiontů tak má lepší přístup ke zdrojům dusíku v půdě a pravděpodobně jich více předává hostiteli (Field et al. 2019). Zároveň

nemusí být tolik závislá na uhlíkatých sloučeninách od rostlinného partnera (Field & Pressel 2018).

AMF pozitivně ovlivňují také proudění vody a produkují látky, jež napomáhají agregaci půdy a tím snižují možnost eroze. Dále jsou schopny redukovat dopad alelopatických látek. Zároveň zlepšují odolnost hostitelských rostlin proti patogenním organismům tím, že pomáhají iniciovat expresi obranných genů rostlin (Delevaux 2017). Druhým způsobem, jak AMF dokáží pomoci obraně rostliny je, že mohou být silnější v boji o kořenový povrch a prostor než houby nemykorhizní, které tak vykompetují (Chagnon & Bradley 2013). Další přínos AMF pro rostliny zaznamenali Poulton et al. (2001). Zjistili, že mykorhizní rostliny druhu *Solanum lycopersicum* měly kvalitnější pyl a byly atraktivnější pro opylovače než rostliny bez AMF v kořenech. V přítomnosti *Glomus etunicatum* měly rostliny také větší biomasu plodů.

1.3 Popisné metody studia společenstev AMF a FE

AMF se dají studovat například pod mikroskopem. Kvantifikují se spory, hyfy v půdě a kolonizace kořenů. Dalším postupem je biochemická determinace AMF specifických mastných kyselin (např. PLFA analýzy) či chitinu. Nejnovějším přístupem jsou molekulární analýzy (Gamper et al. 2008).

Sledováním znaků na sporách lze určit většinu popsanych taxonů. Tato metoda však přináší informace pouze o jejich dormantní fázi. Biochemické a mikroskopické rozborů více říkají o fyziologii a chování hub, avšak nic o jejich taxonomii. Metody molekulární analýzy přináší pohled jak na taxonomické složení společenstva, tak do jisté míry na relativní zastoupení přítomných taxonů. Stále je ale důležité mít na paměti, že data podléhají PCR biasu. To znamená, že primery mohou amplifikovat některé taxony efektivněji (Gamper et al. 2008).

1.3.1 Mikroskopické vyhodnocení kolonizace kořenů AMF a FE

Barvením a následným vyhodnocením pod mikroskopem lze získat data o relativním zastoupení AMF v kořenech. Umožní to zaznamenat přítomnost nejen hyf, ale i množství arbuskul a vezikul (Vierheilig et al. 2005). Zároveň tato metoda může poskytnout informace o míře kolonizace FE. Jejich hyfy menší než 1,5 μm v průměru není složité rozpoznat od hyf AMF, jejichž průměr může dosahovat až 3 μm (Sinanaj et al. 2021). Mezi nevýhody této metody patří zejména to, že obarvení není vždy dostatečně kontrastní a že do poškozených arbuskul se barvivo nedostane (Vierheilig et al. 2005).

Pro kvantifikaci kolonizace kořenů se používají různé metody. K nedestruktivním observačním metodám patří konfokální mikroskopie. Mezi destruktivní patří vitální barvení, které využívá aktivitu enzymů specifických pro houby, a barvení nevitální, které zobrazuje i metabolicky neaktivní tkáň (Vierheilig et al. 2005). Právě poslední jmenovaná možnost je tou nejhojněji užívanou. Jako barviva se například používají Trypan blue, Cotton blue, Chlorazol black E (CBE) či inkoust (Vierheilig et al. 2005).

1.3.2 Molekulární metody

Diverzita a složení společenstva jsou v současné době definovány na základě analýzy dat získaných pomocí sekvenování nové generace (NGS). Ačkoli nám tento způsob poskytuje hlubší pohled do problematiky, data mohou být do jisté míry zkreslena. Získané informace závisí na způsobu jejich získání a dalšího nakládání se vzorky (Hart et al. 2015). Rozdílné závěry o společenstvu AMF přináší zkoumání samotných spor získaných z půdy, sekvenace celkové DNA získané z půdy nebo z kořenů hostitelských rostlin (Sýkorová et al. 2007).

Před samotnou analýzou je důležité, aby získaná DNA nebyla degradovaná. Nejlepším postupem je s dalším zpracováním neotálet, aby se předešlo poškození DNA, případným změnám ve společenstvu hub či degradaci saprotrofy (Hart et al. 2015). Ve většině případů je ale nutné vzorky nějakou dobu skladovat. Nejužívanějšími, a tedy nejspolehlivějšími způsoby uschování je zamražení při -20 až -80 °C či fixace v extrakčním pufru. Pro kořeny se jeví jako nejlepší možnost usušení při teplotě 50 až 60 °C pro svou jednoduchost a nízké náklady (Janoušková et al. 2015).

Pro extrakci DNA se používají protokoly založené na cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB), fenol/chloroformu či izolační kity (Hart et al. 2015). Po izolaci se během polymerázové řetězové reakce amplifikuje cílový úsek DNA. V současné době se pro tyto účely používají zejména ribozomální geny (Hart et al. 2015).

Jaderný ribozomální operon se skládá z genů pro rRNA malé podjednotky (SSU), velké podjednotky (LSU) a internal transcribed spacer (ITS). Jelikož má v jádře více kopií, je snazší ho amplifikovat. I proto je považován za nejvhodnější marker pro sekvenaci. Nejpresnější informace přináší sekvenování celého operonu, jehož technickou limitací je však celková délka 5500 bp (Hart et al. 2015).

Pro většinu studií společenstev se používá SSU, jelikož amplikony mají vhodnou délku pro NGS. Získané sekvence se na základě podobnosti sdružují do clusterů, ze kterých se vytváří operational taxonomic units (OTU). Jde o taxonomické jednotky určené pouze na základě molekulárních dat, nikoli podložené kultivací a morfologickými znaky. Tyto

OTU lze podrobit fylogenetické analýze. Nevýhodou získávání dat z SSU je, že se zde hůře rozlišují druhy uvnitř čeledí Diversisporaceae a Gigasporaceae (Hart et al. 2015).

Další možností je používat pouze ITS, avšak ten přes svou velkou variabilitu neumožňuje rekonstrukci fylogeneze evolučně vzdálenějších OTU AMF. Proto je dobré ITS (stejně jako LSU) používat spíše jako doplňkové markery pro určení blízce příbuzných taxonů, u nichž použití SSU nepřináší dostatečnou informaci (Hart et al. 2015).

V analýze vzniklé OTU jsou pro AMF porovnány s databází obecně přijímaných virtuálních taxonů (VTX) (Öpik et al. 2010). Identifikované VTX jsou pak použity v dalších analýzách. Jelikož k FE existuje zatím pouze málo dat, postup je jiný. Možností je například porovnat OTU s databází verifikovaných sekvencí, jako je např. SILVA (Quast et al. 2013). Vyberou se ty OTU, jež dle databáze spadají do podkmene Mucoromycotina (Albornoz et al. 2021).

1.4 Vliv živin v půdě na AM

Skutečnosti popsané v kapitole 1.2 dělají z AMF významnou součást mnoha ekosystémů. To je často opomíjeno zejména v intenzivně obhospodařovaných zemědělských oblastech. Abiotické podmínky jsou zde upravovány pro větší zisk, nikoli pro lepší funkci ekosystému. Z těch, jež ovlivňují společenstvo AMF, lze jmenovat například vlhkost půdy, její pH a obsah živin v ní (Boeraeve et al. 2019).

Vliv na AMF má i v nynější době hojně zmiňovaný problém nedostatečné fragmentace krajiny. Člověk vytvořil prostředí, ve kterém se objevují monokulturní porosty, jež by přirozeně nikdy nevznikly. Boeraeve et al. (2019) zjistili, že větší fragmentace krajiny má pozitivní vliv na diverzitu společenstva AMF.

Do všech typů zemědělských porostů jsou pravidelně přidávány živiny, často v anorganických formách. V některých druzích hnojiv jsou fosfor a dusík dodávány současně – například monoamoniumfosfáty (MAP), případně diamoniumfosfáty (DAP). Přitom každá živina zůstává v půdě jinak dlouhou dobu. Fosfor zde zůstane déle, a naopak mobilnější dusík rychleji unikne (zejména v nitrátové formě). Vliv na AM má pak nejen samotné množství živin, ale i jejich poměr (Egerton-Warburton et al. 2007; Antunes et al. 2012).

Při vhodném hospodaření mohou být AMF naopak dobrým mechanismem pro snížení nutnosti dodávky živin do půd. Bylo by tak ušetřeno nejen životní prostředí, ale i finanční zdroje. Je zde ale bohužel nespočet úskalí, proč na tyto výhody není brán zřetel.

Právě proto je důležité lépe pochopit význam a charakter společenstev AMF (Antunes et al. 2012).

Nejprozkoumanější součástí výměny živin mezi hostitelskou rostlinou a AMF je fosfor. Pokud je ho v půdě zvýšené množství, rostliny ho mohou získat bez potřeby AMF, tedy i bez potřeby předávat uhlík svým houbovým partnerům. Za těchto podmínek mohou rostliny kolonizaci AMF omezit (Bennett & Groten 2022).

Na stanovištích, která nejsou limitována fosforem je nejnižší taxonomická rozmanitost AMF společenstva (Egerton-Warburton et al. 2007). Mají zde tendenci dominovat taxony z čeledi Glomeraceae. Naopak, když dostupnost fosforu klesá, rozmanitost společenstva hub spíše roste, stejně jako relativní podíl AMF taxonů z čeledi Acaulosporaceae a Gigasporaceae (Egerton-Warburton et al. 2007).

Přidání anorganického dusíku do půdy může vést k poklesu abundance AMF a změně společenstva. Za jiných podmínek ale toto přidání dokáže naopak stimulovat rostliny, aby více investovaly asimiláty do svého houbového partnera (Chagnon & Bradley 2013).

Reakce se liší i v závislosti na čeledi houbového partnera. Zatímco houby z čeledi Gigasporaceae jsou na větší obsah dusíku citlivé, taxony z čeledi Glomeraceae ho zvládají s mnohem menšími obtížemi (Treseder et al. 2018). Tento trend nejspíš pramení z jejich rozdílného hospodaření s uhlíkem získaným od rostliny. Zástupci z čeledi Gigasporaceae vytvářejí rozsáhlejší mimokořenové mycelium, a tak potřebují více uhlíku, aby svou síť vybudovaly. Pokud rostlina omezí přísun uhlíku houbě z toho důvodu, že přísun živin má dostatečný i bez symbionta, četnost hub z čeledi Gigasporaceae se sníží. Oproti tomu taxony čeledi Glomeraceae vytvářejí více biomasy uvnitř kořene symbionta, a tak nemají tolik vysoké nároky na množství přijatého uhlíku (Treseder et al. 2018).

V půdách, kde je limitujícím prvkem fosfor, může přidání dusíku houbám z čeledi Gigasporaceae naopak pomoci. Jejich rozsáhlejší mycelium totiž zajišťuje lepší příjem fosforu, a tak je rostlina selektivně podporuje (Treseder et al. 2018). Toto tvrzení ale neplatí obecně. Chování hub i rostlin totiž závisí na poměru živin v půdě a dalších jejích vlastnostech (Johnson 2010). Yang et al. (2017) například uvádí, že (i přes menší mycelium v půdě) měly nejvíce pozitivní vliv na příjem fosforu zástupci čeledi Glomeraceae.

Mykorrhizní symbióza je soužití dvou organismů, které se tak za různých podmínek může pohybovat na spektru mutualismus – parazitismus. To, zda je vztah spíše záporný či kladný, mohou ovlivňovat například abiotické podmínky, jako je teplota či obsah živin v půdě (Antunes et al. 2012). Dalším aspektem může být původ rostliny a houby.

Pokud rostliny a jejich houboví symbionti pocházejí ze stejné oblasti, mají větší tendenci vytvářet mutualistický vztah. Polarita vztahu nezávisí na druhu symbiotické rostliny – jeden druh AMF může s jedním druhem rostliny vytvářet různě prospěšný vztah v závislosti na podmínkách (Klironomos 2003).

Z toho plyne možný problém komerčních inokul pro dodání AMF do půdy. Nejen, že se jedná o druhy neadaptované na konkrétní podmínky, současně tyto přípravky bývají složeny jen z mála druhů AMF. Například firma Symbiom má ve svých přípravcích pouze 5 druhů AMF (Symbiom 2021). Pro lepší podporu rostlin je vhodné mít společenstvo hub diverzifikované (Klironomos 2003) s tou podmínkou, že by mělo obsahovat více čeledí – protože zejména tato taxonomická úroveň hraje největší roli v různorodosti nabízených služeb (Yang et al. 2017).

Zároveň je ale důležité mít na paměti, že mechanismy fungování symbiomy nejsou dostatečně prozkoumány. Benefity a náklady soužití nejsou monitorovány u AMF, ale pouze u jejich rostlinných partnerů. Ani u nich nejsou známy dostatečně všechny aspekty. Výzkumy cílí především na hledisko podpory růstu hostitelských rostlin a dodávání živin. V takovém případě může soužití vypadat, že se pohybuje v parazitické části spektra, avšak AMF může přispívat například k větší fertilitě hostitele (Bennett & Groten 2022).

Nedostatek informací je patrný zejména pro AMF. Jen menší část těchto hub lze kultivovat, a tedy jen o této menší skupině jsou podrobnější informace. Existují data i z terénních výzkumů, ve kterých jsou zastoupeny i taxony, jež nelze kultivovat. Více podrobnějších informací však o nich zatím nelze získat (Ohsowski et al. 2014).

Přesnost dat z terénu je těžké určit i proto, že není přesně známo, jak se společenstvo proměňuje v průběhu sezóny (Hart et al. 2015). Ani distribuce AMF po světě není dostatečně prozkoumána. Momentálně dochází ke zdánlivě vyšší koncentraci taxonů v Evropě, jelikož odsud pochází největší počet studií (Větrovský et al. 2023).

Sýkorová et al. (2007) zjistili, že některé druhy AMF, mezi které patří například *Glomus mosseae* (dnes *Funneliformis mosseae*), lze definovat jako prvotní kolonizátory. Zatímco jeho abundance po 3 měsících pokusu byla hojná, v 10 měsících rapidně poklesla. Tyto druhy zároveň lépe přežívají ve skleníku. Můžeme je označit za r-stratégy. K-stratégy jsou AMF objevující se více v přirozeném ekosystému, a to až v pozdějších stádiích vývoje. Za generalistu lze považovat například *G. irregulare* (dnes *Rhizophagus irregularis*), který prakticky nevykazuje stanovištní preference.

Generalizovat poznatky o druzích, které lze kultivovat, je problematické, a to zejména proto, že jde o druhy, jež jsou schopny přežít podmínky skleníku. Mohou se tedy chovat jinak než zbytek nekultivovatelných AMF. Bylo zjištěno, že techniky kultivace mají na složení společenstva AMF větší dopad než druh hostitelské rostliny (Sýkorová et al. 2007). Pro všechny AMF nebo pro čeledi různých taxonů je tedy těžké vyvozovat nějaké obecné biologické chování. Momentálně je 89 taxonů charakterizováno jako druh, což je vzhledem k téměř 1 500 molekulárním taxonům jen velmi malé číslo (Větrovský et al. 2023).

1.5 Vliv hostitelské rostliny na AM

Chování hub nereaguje jenom na poměr živin v půdě. Složení společenstva AMF se liší například i v závislosti na CSR strategii hostitelských rostlin či na jejich růstové formě, na způsobu fotosyntézy (C3 či C4) či na soužití s dalšími, například dusík fixujícími organismy (Davison et al. 2020).

Obecně se u bylinných forem rostlin vyskytuje více mykorhizních hub než u forem stromových (Davison et al. 2020). Největší diverzita se nachází u dvouděložných, neruderálních rostlin. To, že je společenstvo AMF chudší u ruderálních druhů rostlin lze vysvětlit tím, že žijí v prostředích se zvýšeným obsahem živin. U ruderálních druhů rostlin se objevovaly převážně kultivovatelné AMF (Davison et al. 2020). Stejný typ AMF obecně preferuje jednoleté byliny. Oproti trvalkám, do kterých prorůstají hyfy z okolní myceliální sítě, ruderální druhy jsou častěji osidlovány ze spor (Chagnon et al. 2013)

Při změně poměru dusíku a fosforu v půdě existuje rozdíl v mykorhizních interakcích mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami. Unger et al. (2016) přišli s hypotézou, že traviny investují méně do symbiózy a spoléhají se více na svůj kořenový povrch než dvouděložné rostliny.

Tomuto tvrzení se mimo jiné věnovali i Šmilauer et al. (2021) ve studii, na kterou navazuje tato bakalářská práce. Část výzkumu se zabývala otázkou, jaké jsou změny ve složení AMF a FE společenstev a jejich attributech na louce a ve skleníku a v závislosti na hnojení. Srovnávány byly tři úrovně ošetření: hostitelské rostliny rostoucí na louce a květináče s rostlinami ve skleníku hnojené a nehnojené. Bylo zjištěno, že diverzita společenstva AMF u jednoděložných rostlin nebyla výrazně ovlivněna stanovištěm (louka vs. skleník) či hnojením. Naproti tomu u dvouděložných vliv těchto faktorů přinesl intenzivnější odpověď. Největší diverzita byla zaznamenána na louce, nejmenší naopak v přihnojovaných květináčích.

Intenzitu kolonizace kořenů AMF zkoumali Šmilauer et al. (2021) pod světelným mikroskopem. Závěrem bylo, že celková míra kolonizace byla nižší u trav. Zvláště výrazný pokles pak byl ve vzorcích ze skleníku s přidáním hnojivem. Co se týče FE, ve skleníku bylo s přidáním hnojiva zaznamenána snížená kolonizace. I zde byl tento efekt výraznější u trav.

Tento výzkum se zabýval vlivem společného hnojení dusíkem i fosforem. Z výše uvedených informací ale plyne, že je důležité zkoumat dopad jednotlivých živin na společenstvo AMF. A právě to je předmětem mé bakalářské práce.

2 Cíle a hypotézy práce

Cílem mé práce bylo porovnat u vybraných zástupců jedno- a dvouděložných bylin pěstovaných ve skleníku vliv přidání dusíku a fosforu (v kombinaci i samostatně) na intenzitu kolonizace kořenů AMF a FE a na složení a diverzitu společenstev těchto hub v kořenech hostitele.

Mnou očekávané výsledky lze shrnout v následujících hypotézách:

H1: Po přidání fosforu se sníží kolonizace AMF i FE.

H2: AMF i FE kolonizace v jednoděložných rostlinách po přidání živin do substrátu poklesne výrazněji než u dvouděložných.

H3: Ve vzorcích hnojených fosforem bude menší taxonomická diverzita AMF.

3 Metodika

3.1 Skleníkový pokus

3.1.1 Zvíkov – zdrojová lokalita

Půda na skleníkový pokus i semena vybraných druhů rostlin pocházely z lokality Zvíkov. Lokalita (48° 59' 20" N, 14° 36' 28" E) se nachází u obce Zvíkov, 12 km východně od Českých Budějovic. Jedná se o 30 let nehnojenou oligotrofní louku v přibližné nadmořské výšce 500 m n. m. s průměrným poměrem dostupných forem živin N:P 2,68. Kosení louky probíhá každoročně v červnu.

3.1.2 Založení pokusu

Pokus probíhal od poloviny dubna do začátku července 2021 ve skleníku Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Skleník byl bez možnosti cílené regulace teploty a přímé sluneční záření bylo zmírněno natažením bílé netkané textilie nad stůl s květináči.

Pro pokus byly vybrány dva druhy dvouděložných bylin (*Plantago lanceolata* – PL, *Betonica officinalis* – BO) a dva druhy trav (*Anthoxanthum odoratum* – AO, *Poa angustifolia* – PA). Semena byla předchozí rok nasbírána na lokalitě Zvíkov (viz výše). Před samotným pokusem byla vyzkoušena jejich klíčivost. Vyseta byla 8. dubna do velkých Petriho misek se sterilním pískem. Po dobu klíčení byla uchovávána v klimaboxu.

Ze stejné lokality byla týden před založením pokusu odebrána svrchní vrstva půdy do hloubky 10 cm. Nadzemní biomasa byla odstraněna, půda byla rozmělněna, zbavena oddenků a velkých kořenů a kamenů, menší kořeny byly nastříhány a vráceny zpět. Takto připravená půda byla následně dobře promíchána. Ve stavební míchačce vysterylizované Savem byla půda smíchána se sterilním pískem v poměru 1:2.

Do dvoulitrových vysterylizovaných květináčů naplněných substrátem byly vysazeny vždy 3 semenáčky jednoho druhu staré maximálně 1 týden – každý druh do 20 květináčů (Obr. 1). Pokud do týdne po prvním hnojení došlo k úhynu semenáčku, byl nahrazen semenáčkem novým.

Jednotlivé květináče byly po přesazení všech rostlin ošetřeny jedním ze čtyř způsobů: vodou, přihnojení dusíkem, fosforem nebo oběma prvky (viz dále). Každý druh měl pro každé ošetření 5 opakování. Výsledných 80 květináčů bylo ve skleníku rozmístěno na jeden stůl do 5 znáhodněných bloků (Tab. 1, Obr. 2).



Obr. 1: Tři semenáčky BO ve dvoulitrovém květináči. **Obr. 2:** Uspořádání pokusu ve skleníku.

Tab. 1: Schéma znáhodněných bloků.

| | | | |
|---------|---------|---------|--------|
| PL / 0 | PA / P | PL / P | PA / N |
| AO / P | PA / NP | AO / NP | BO / N |
| PL / NP | AO / 0 | BO / NP | BO / 0 |
| PL / N | PA / 0 | AO / N | BO / P |

| | |
|-------------|-------------|
| AO / 0,5 NP | PL / 0,5 NP |
| BO / 0,5 NP | PA / 0,5 NP |

zkoušební květináče

| | | | |
|---------|--------|---------|---------|
| PL / 0 | BO / P | PL / P | PA / P |
| PA / NP | AO / P | PL / N | PA / 0 |
| PL / NP | BO / N | AO / N | BO / NP |
| PA / N | BO / 0 | AO / NP | AO / 0 |

blok 1

blok 2

| | | | |
|---------|---------|---------|---------|
| AO / NP | PL / NP | AO / 0 | AO / N |
| PL / 0 | BO / NP | PA / P | BO / P |
| PL / P | PA / NP | PA / N | AO / P |
| BO / 0 | BO / N | PA / 0 | PL / N |
| PL / N | PA / NP | AO / 0 | PL / 0 |
| PA / 0 | PA / P | BO / P | BO / N |
| PA / N | PL / P | AO / P | BO / NP |
| AO / NP | PL / NP | BO / 0 | AO / N |
| AO / 0 | AO / N | AO / P | BO / 0 |
| PA / NP | BO / P | AO / NP | PL / N |
| BO / NP | BO / N | PL / P | PA / P |
| PL / 0 | PL / NP | PA / N | PA / 0 |

blok 5

blok 4

blok 3

3.1.3 Hnojení

Květináče byly hnojeny v průběhu pokusu dvakrát. První hnojení proběhlo den po výsadbě semenáčků posledního druhu a druhé po 6 týdnech. V průběhu pokusu byly květináče zalévány vodou.

Jako dusíkaté hnojivo byl použit dusičnan amonný (NH_4NO_3) a jako zdroj fosforu dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Při prvním hnojení bylo do 200 ml vody na jeden hnojený květináč přidáno 0,897g NH_4NO_3 a/nebo 0,356 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, což odpovídá 0,314 g dusíku a 0,071 g fosforu. Jelikož semenáčky BO v květináčích s přidáním dusíkem umíraly, a to i po opakované výsadbě, pro druhé hnojení byla pro všechny druhy použita pouze poloviční navážka obou hnojiv.

3.1.3 Zkušební květináče

Týden před samotným zahájením pokusu byly založeny 4 zkušební květináče, po jednom dvoulitrovém květináči od každého druhu se 3 semenáčky. Květináče byly hnojeny také dvakrát, ale pouze poloviční dávkou dusíku i fosforu. Podzemní biomasa byla po 12 týdnech odebrána a vyčištěna, kořeny byly použity pro optimalizaci postupu barvení (kapitola 3.2.1.1).

3.1.4 Ukončení pokusu, zpracování biomasy

Po 12 týdnech od prvního hnojení byl pokus ukončen. Nadzemní biomasa byla odebrána a rozdělena na živé a odumřelé listy. U kvetoucích jedinců PL byly zvláště odebrány květní stvoly. Živé listy byly 48 hodin sušeny na 80 °C, zváženy a uschovány na chemické analýzy.

Kořeny byly zbaveny substrátu, nahrubo očištěny pod vodou v sítu s 1mm oky a dočištěny ručně v misce s vodou. Náhodně vybraných 8-12 laterálních kořenů z každého květináče bylo odebráno na obarvení AMF a FE a pozdější mikroskopické vyhodnocení. Dalších 8–12 kořenů bylo 12 hodin sušeno při 60 °C a následně uchováno při –20 °C na pozdější zpracování pro molekulární analýzu.

Laterální kořeny určené na mikroskopické vyhodnocení a molekulární analýzu byly zváženy v čerstvém stavu. Část zbývajících kořenů, která byla odebrána na následné chemické analýzy, byla zvážena v čerstvém stavu i po sušení po dobu 48 hodin při teplotě 80 °C. Zbytek kořenů byl sušen stejnou dobu při stejné teplotě a zvážen byl pouze v suchém stavu. Hmotnost celé podzemní biomasy v suchém stavu byla určena výpočtem. U PA byla zaznamenána hmotnost usušených oddenků.

3.2 Odhad intenzity kolonizace kořenů AMF

3.2.1 Barvení AMF v kořenech rostlin

K barvení hub kolonizujících vypreparované kořeny byl zvolen postup užívající Chlorazol Black E (CBE) dle Vierheilig (2005), s modifikacemi dle Štajerová et al. (2009). Doba inkubace kořenů v hydroxidu draselném (KOH) za pokojové teploty a doba barvení v CBE při teplotě 90 °C byly pro jednotlivé druhy modifikovány na základě předchozího pokusu s kořeny ze zkušebních květináčů.

3.2.1.1 Volba parametrů barvení

Od každého druhu bylo vybráno 8krát 10 laterálních kořenů, které byly podrobeny různě dlouhé inkubaci v KOH za pokojové teploty (7, 10, 13 a 16 hodin) a dvěma variantám barvení v CBE při teplotě 90 °C (45 a 60 min). Z obarvených kořenů byly zhotoveny

preparáty (viz kap. 3.2.2), na kterých bylo pod mikroskopem vyhodnocováno, jaký bude ideální postup při barvení jednotlivých druhů.

U dvouděložných rostlin se doba inkubace v KOH 10 hodin a méně ukázala jako nevhodná. Kořeny zůstávaly příliš kompaktní, nebylo je tedy možno roztlačit tak, aby byly viditelné všechny pozorované struktury. Barvení v roztoku CBE po dobu 45 min se ukázalo nedostatečné, jelikož obarvené houbové struktury nebyly dostatečně kontrastní. Pro barvení BO a PL bylo proto zvoleno louhování v KOH po dobu 16 hodin a následné barvení při 90 °C po dobu jedné hodiny.

V případě trav se následkem pohnojení v preparátech prakticky žádné obarvené AMF nevyskytovaly. To ztížilo odhad pro ideální postup při barvení. Vzhledem k menšímu průměru kořenů byla zvolena kratší doba louhování v KOH – pouze 13 hodin a na základě konzistence kořenů bylo zvoleno barvení při 90 °C po stejnou dobu jako u dvouděložných rostlin (jedna hodina).

3.2.1.2 Použitý protokol barvení

Očistěné laterární kořeny byly inkubovány za pokojové teploty v 10% KOH - kořeny PL a BO po dobu 16 hodin, kořeny AO a PA 13 hodin. Po vyjmutí z KOH byly důkladně propláchnuty vodou na jemném sítku a na Petriho misce 1–2 min okyseleny 3,5% HCl.

Kořeny byly osušeny na buničině a přeneseny do varných zkumavek, zality barvicím roztokem (0,03% CBE v laktoglycerolu – kyselina mléčná, glycerol a sterilní voda v poměru 14:1:1) a inkubovány 60 min při teplotě 90 °C. Kořeny byly opět scezeny přes sítko a přemístěny do lahvíček s laktoglycerolem, kde byly ponechány několik dní, aby se vyplavilo přebytečné barvivo.

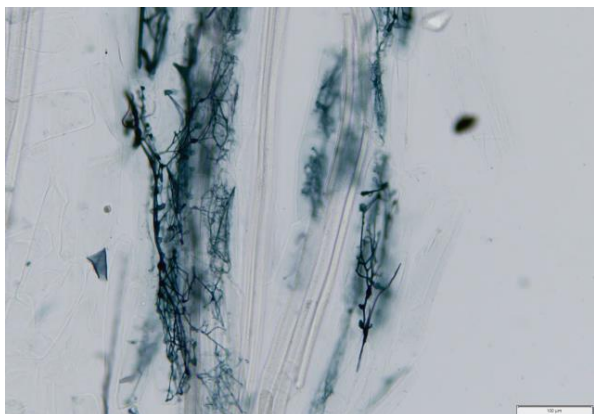
3.2.2 Příprava preparátů

Z kořenů jedinců v jednom květináči byl zhotoven jeden preparát. U dvouděložných rostlin bylo na podložní sklo do kapky laktoglycerolu položeno souběžně 11 úseků laterárních kořenů. Kořeny trav byly jemnější a více potřhané, úseků tedy bylo více a nebyly rozmístěny tak pravidelně.

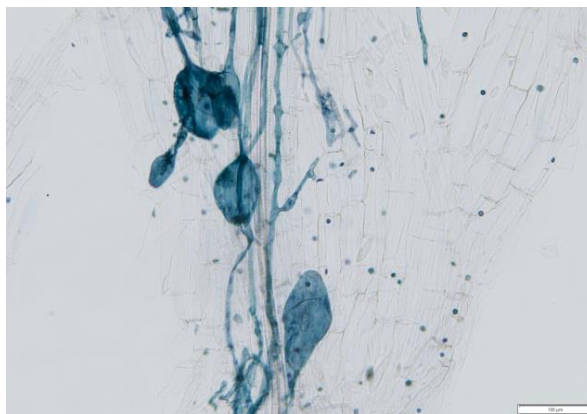
Přitlačení krycího skla byly připraveny roztakové preparáty. Okraje krycího skla byly překryty 2 vrstvami bezbarvého laku na nehty, aby roztok nevysychal a bylo možno s preparáty následující půl rok pracovat. Hotové preparáty byly uchovávány v lednici.

3.2.3 Vyhodnocování kolonizace

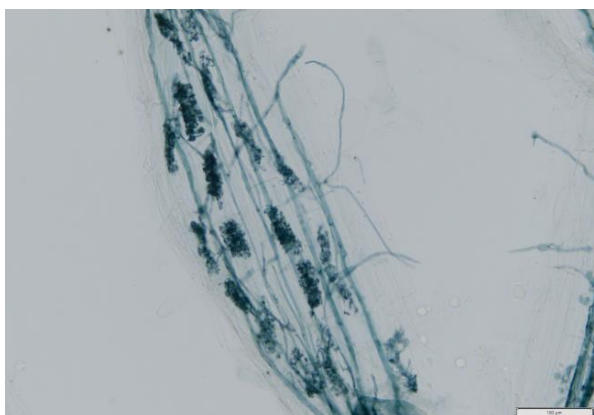
Vyhodnocování míry kolonizace AMF a FE bylo provedeno pod světelným mikroskopem Olympus BX50 při zvětšení 200x. Jednotlivé kořeny byly podrobeny důkladnému odhadu celkové přítomnosti FE (Obr.3) a AMF, jejich vezikul (Obr. 4) a arbuskul (Obr. 5 a Obr. 6).



Obr. 3: FE v kořeni AO (zvětšení 200x). Úsečka v pravém dolním rohu odpovídá 100 μm.



Obr. 4: Vezikuly s hyfami AMF v kořeni PL (zvětšení 200x). Úsečka v pravém dolním rohu odpovídá 100 μm.



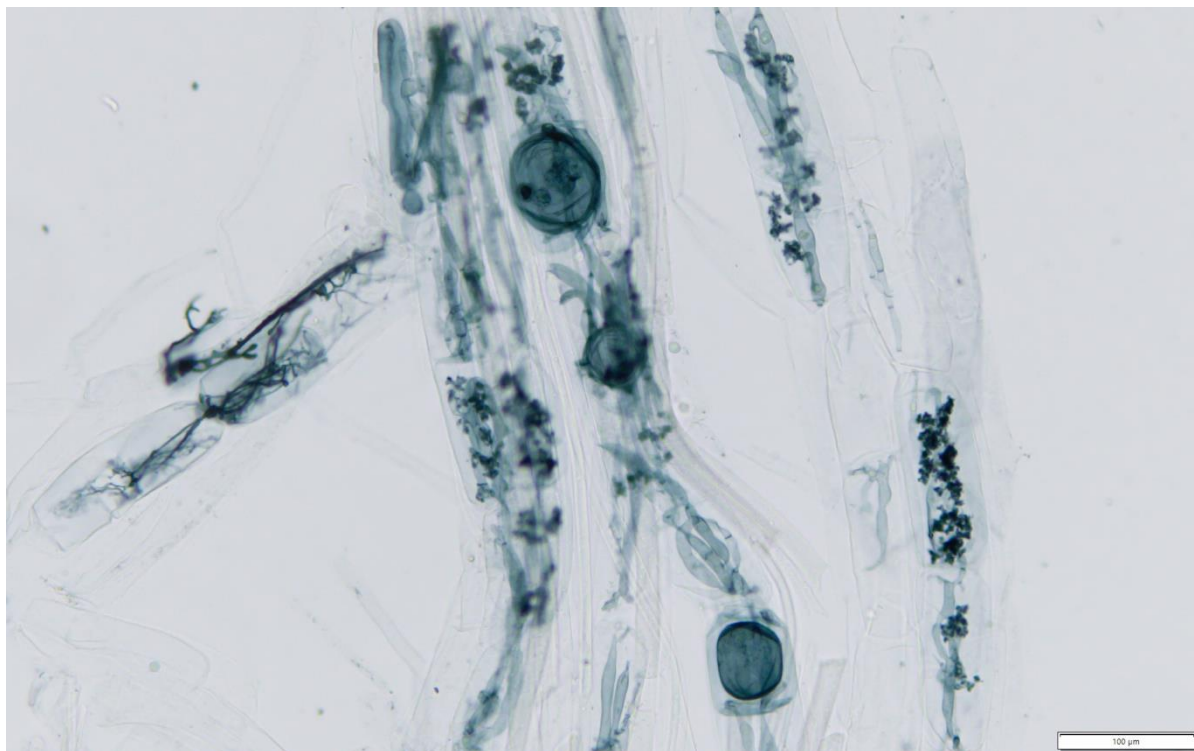
Obr. 5: Arbuskuly s hyfami AMF v kořeni BO (zvětšení 200x). Úsečka v pravém dolním rohu odpovídá 100 μm.



Obr. 6: Detail arbuskul v kořeni AO (zvětšení 400x). Úsečka v pravém dolním rohu odpovídá 50 μm.

Každý kořen byl rozdělen do jednotlivých zorných polí, která na sebe těsně navazovala, ale nepřekrývala se. Tímto způsobem bylo možno prozkoumat celé kořeny po jednotlivých segmentech. Procentuální kolonizace všemi sledovanými charakteristikami byla v každém zorném poli odhadnuta vzhledem k délce kořene a zaznamenána do programu MS Excel.

Na Obr. 7 je příklad kořene, který má 100% celkovou kolonizaci AMF, 95% arbuskulární, 25% vezikulární a 50% kolonizaci FE. Jelikož kvalita obarvení vzorků nebyla konstantní, byla do programu MS Excel zaznamenána rovněž míra kvality v procentech pro každé zorné pole.



Obr. 7: Příklad úseku kořene AO kolonizovaného AMF i FE (zvětšení 200x). Úsečka v pravém dolním rohu odpovídá 100 μm.

3.2.4 Zpracování dat

Nejprve byla spočtena průměrná procentuální kolonizace AMF, vezikul, arbuskul a FE v jednotlivých vzorcích. Pro každý vzorek byla spočtena i průměrná kvalita obarvení, která byla v následujícím vyhodnocení použita jako váha jednotlivých vzorků.

Z výsledného souboru dat byl v programu R (R Core Team 2021) vyhodnocen vliv rozdílné dostupnosti živin na procentuální zastoupení vyhodnocovaných charakteristik (celková kolonizace AMF, jejich vezikul a arbuskul, a kolonizace FE). Použitou metodou byla dvoucestná ANOVA. Odhadnutá procenta kolonizace byla upravena arcsinovou transformací.

3.3 Stanovení společenstva AMF a FE v kořenech pokusných rostlin

3.3.1 Příprava kořenů

Kořeny uschované na zpracování molekulárními metodami byly dva dny před zpracováním vyjmuty z mrazáku a ponechány při pokojové teplotě.

Kořeny (5–15 mg) byly nastříhány na malé segmenty do 2ml mikrozkušavek tak, aby vyplňovaly maximálně polovinu objemu. Pokud bylo biomasy více, vzorek se rozdělil do více mikrozkušavek. Kořeny byly drceny na oscilačním mlýnu Retsch 400MM 8–10 kovovými kuličkami při frekvenci 24 Hz po dobu 20 min. Vzorky, ve kterých po dvacetiminutovém mletí zůstávaly drobné segmenty, byly mlety ještě po dobu několika dalších minut.

3.3.2 Izolace DNA – CTAB protokol

Na izolaci DNA z kořenů byla použita modifikace CTAB metody (Doyle & Doyle, 1987).

Do mikrozkušavek s rozdrcenými kořeny bylo přidáno 700 μ l zásobního roztoku CTAB. Pokud bylo materiálu více, bylo přidáno ještě po 300 μ l zásobního roztoku tak, aby veškerý prášek vytvořil tekutou suspenzi. Uzavřené zkumavky byly proklepáním promíchány a přes noc inkubovány na třepačce při teplotě 50 °C.

Ráno byly zkumavky stočeny na stolní centrifuze po dobu 2–3 s. Supernatant byl přenesen do nových 1,5ml mikrozkušavek a vzorky, jež byly rozděleny, byly slity dohromady. Objem všech vzorků byl upraven na 700 μ l. Pokud měl vzorek objem větší, byl přebytek zamražen, pokud bylo naopak vzorku méně, byl dolit zásobním roztokem.

Poté bylo v digestoři přidáno 500 μ l směsi chloroformu s isoamylalkoholem (24:1). Zkumavky byly několikrát převráceny a po 10minutovém stání byly centrifugovány po dobu 10 min při 10 000 rpm. Tím se vytvořilo viditelné rozhraní mezi vodní a chloroformovou fází.

Do nových 1,5 ml zkumavek byla v digestoři přepipetovaná horní vodní fáze. K ní bylo přidáno 500 μ l vychlazeného isopropanolu. Před centrifugováním byly vzorky opět několikrát převráceny a následně stály alespoň 30 min při teplotě –20 °C. Na centrifuze byly otáčky zvýšeny na 13 000 rpm a čas nastaven na 5 min.

Tím vznikl na dně zkumavky drobný pelet DNA, od kterého byla odpipetována kapalina. Po přidání 400 μ l vychlazeného 96% ethanolu byla zkumavka proklepnuta, aby se pelet uvolnil od stěny. Vzorky byly opět centrifugovány po dobu 5 min při 13 000 rpm.

Kapalina byla odpipetována a zbylý pelet byl zalit 200 μ l vychlazeného 70% ethanolu. Následné proklepnutí opět uvolnilo sraženinu. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 min při 13 000 rpm. Veškerá kapalina byla znovu opatrně odpipetována a pelet byl ponechán při pokojové teplotě doschnout.

Do mikrozkušavek bylo následně přidáno 105 μ l TE pufru. Za občasného proklepávání byly vzorky inkubovány alespoň 30 min při pokojové teplotě. Před dalším postupem byla odebrána část vzorku na kontrolu kvality pomocí elektroforézy: 3 μ l DNA byly smíchány s barvivem GelRed a naneseny na 1,5% agarózový gel v TBE pufru. Po kontrole byl vzorek DNA purifikován komerčním kitem PowerClean DNA Clean-up Kit (Qiagen) dle návodu výrobce. Následně byly koncentrované vzorky naředěny v poměru 1:10 se sterilní vodou.

3.3.3 PCR

Během semi-nested PCR (polymerázová řetězová reakce) byly amplifikovány fragmenty dlouhé 250 bp z oblasti 18SSU rDNA. Použit byl pár primerů specifický pro AMF – AMV4.5NF a AMDGR dle Sato et al. (2005).

Celá příprava vzorků na PCR probíhala na ledu, aby nedošlo k degradaci vyizolované DNA. Potřebné reagentie byly s předstihem vyndány z mrazáku a před použitím promíchány. Pro PCR byly použity tzv. barcodované primery, které na svém 5' konci nesly 10bázovou identifikační sekvenci. Při použití 4 různě barcodovaných AMDGR primerů a 19 různě barcodovaných AMV4.5NF primerů bylo možné vytvořit celkem 76 barcodových kombinací, které byly dostatečné pro rozlišení všech vzorků. Vždy 19 vzorků mělo stejný AMV4.5NF barcode primer, a navzájem byly odlišovány pomocí AMDGR barcode primerů. Na 19 vzorků bylo použito 205 μ l sterilní H₂O, 43,4 μ l primeru a 358,7 μ l Plain PP mixu.

Promíchaná směs byla rozpipetována do stripů po 29,4 μ l směsi. Následně bylo do stripů přidáváno 2,1 μ l příslušného AMDGR barcode primeru. Z každého vzorku bylo odebráno do nových stripů 4,5 μ l pro negativní kontrolu. Do vzorků byly přidány 3 μ l templátové DNA. Tyto zkumavky byly ještě rozděleny na dvě opakování po 10 μ l, pro eliminaci vlivu biasu vznikajícího při PCR.

Následně byly všechny stripy vloženy do cykleru s nastaveným programem: 95 °C na 3 min; 30x: 95 °C na 30 s, 55 °C na 30 s a 72 °C na 30 s; 72 °C na 30 s a hold na 15 °C. U vzorků s malou koncentrací bylo množství cyklů zvýšeno na 35. Výsledek PCR reakce byl zkontrolován elektroforézou na agarosovém gelu.

3.3.4 Vyřezávání z gelu

Byl připraven 1,5% agarózový gel v 1× TBE pufru. Po 30 minutách tuhnutí byl gel vložen do elektroforézy a zalit 1× TBE pufrem. 28 µl z jednotlivých vzorků získaných z PCR reakce bylo smícháno s 5 µl nanášecího pufru s barvivem Sybr Green. Po 10 min inkubace byla směs nanášena na gel a spuštěna elektroforéza.

Hotový gel byl přenesen na modré světlo, kde byly pomocí skalpelu vyříznuty proužky každého vzorku o přibližné délce 280 bp. DNA byla z gelu extrahována a přečištěna kitem Macherey Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) dle návodu výrobce.

3.3.5 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích byla stanovena fluorometrem Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) pomocí dsDNA BR Assay kitu.

Nejprve byl připraven roztok pro příslušný počet vzorků s rezervou: 199 µl Qubit Buffer a 1 µl Qubit Reagent na jeden vzorek. Dále byly připraveny dva standardy: S1 obsahoval 190 µl roztoku barviva a 10 µl zásobního roztoku Standardu 1; S2: obsahoval 190 µl roztoku barviva a 10 µl zásobního roztoku Standardu 2. Zkumavky byly promíchány a ponechány 5 min inkubovat ve tmě při pokojové teplotě.

Do nových zkumavek bylo napipetováno 199 µl barviva a 1 µl jednotlivých vzorků. Po promíchání byly inkubovány po dobu 5 min opět ve tmě při pokojové teplotě.

Přístroj byl nejprve zkalibrován změřením standardů S1 a S2. Dále byly měřeny zkumavky s jednotlivými vzorky. Jednotlivé hodnoty byly zaznamenány do programu MS Excel.

3.3.6 Příprava vzorků pro sekvenování DNA

Z koncentrace vzorků bylo vypočteno, jaký je třeba jejich objem, aby ve výsledném poolu bylo od každého vzorku 20 ng DNA. Zjištěný objem od každého vzorku byl přepipetován do jedné mikrozkušavky. Výsledná směs byla purifikována pomocí Agencourt AMPure XP magnetických kuliček. Ke 173 µl směsi bylo přidáno 277 µl magnetických kuliček (poměr objemů 1:1,6), po magnetické separaci a dvojitým propláchnutím kuliček 70% ethanolem byla DNA eluována do 40 µl TE pufru.

Koncentrace DNA byla ověřena pomocí Qubit 2.0 (dsDNA BR Assay kitu, viz výše) a finální vzorek byl odeslán firmě SEQme na 250 bp paired-end Illumina sekvenování.

3.3.7 Zpracování NGS dat

Výstupem sekvenování byly 2 soubory formátu fastq dohromady s 1 133 208 Illumina ready. První soubor obsahoval data ze sekvenování molekul od forward a druhý od reverse primeru (každý ze souborů obsahoval 566 604 readů).

Prvním krokem bylo odpovídající párové ready z obou souborů (od forward a reverse konce) spojit v kontinuální sekvence v programu SEED2 (Větrovský et al. 2018). Toto spojení bylo provedeno byl-li překryv readů minimálně 25 bp a v něm shoda bází minimálně 25 %. Poté byly v programu PipeCraft 2 odstraněny nedostatečně kvalitní sekvence: s více než dvěma potenciálně chybně čtenými bázemi (1 % z celkové délky cílové sekvence) a sekvence kratší než 150 bází. Výsledný soubor obsahoval 554 656 spojených sekvencí.

Roztřídění sekvencí do jednotlivých vzorků dle barcodů proběhlo opět v programu SEED2. Nejprve byl vyhledán barcode forward primerů AMV4.5NF. Do názvu sekvence bylo přidáno označení barcodu a samotný primer byl ze sekvence odstraněn. To samé bylo provedeno i s barcody reverse primerů AMDGR. Výsledná kombinace barcodů v názvu umožnila přiřadit k sekvencím názvy vzorků, ze kterých byly získány. Tím byly vzorky připraveny na identifikaci sekvencí.

3.3.7.1 Identifikace AMF

K identifikaci taxonů AMF byla použita data z online databáze MaarjAM (Öpik et al. 2010). Tato databáze zahrnuje verifikované AMF sekvence, které její autoři klasifikovali do tzv. virtuálních taxonů (VTX) na základě fylogenetických analýz. Blast analýza proběhla v programu SSu-pipeline (Vasar et al. 2017) v operačním systému Linux. Pro analyzované sekvence byly hledány jim nejpodobnější databázové sekvence známých AMF taxonů.

Pokud daná analyzovaná sekvence vykazovala minimálně 97% sekvenční podobnost při minimálně 95% délce párového alignmentu s nejpodobnější databázovou sekvencí konkrétního AMF taxonu, byla považována za daný AMF taxon. V programu Mothur pak byly vybrány veškeré detekované sekvence AMF původu a v programu SEED2 k nim bylo přiřazeno jméno daného taxonu.

3.3.7.2 Identifikace FE

Zbytek sekvencí, které neprokázaly shodu s žádným taxonem podkmene Glomeromycotina, byl podroben další analýze. Nyní byla cílem identifikace sekvencí FE z podkmene Mucoromycotina. Tato skupina organismů nemá svou databázi, a tak byla dle Albornoz et al. (2021) použita databáze SILVA (Quast et al. 2013).

Nejprve byly v programu SEED2 vytvořeny clustery zahrnující sekvence o vzájemné podobnosti alespoň 97 %. Z každého clusteru byla vybrána nejčastější sekvence, která byla následně podrobena porovnávání se SILVA databází. Z výsledného souboru dat byly odstraněny sekvence, které měly shodu s databází méně než 95 %.

Získané sekvence mohly odpovídat různým skupinám organismů. Byly tedy filtrovány pouze ty, které spadaly do podkmene Mucoromycotina. Z tohoto podkmene byly jako cílové clustery sekvencí vybrány pouze ty, které nespadaly pod žádný známý nemykorhizní rod či druh.

3.3.7.3 Zpracování finálního souboru dat

Nakonec byl v SEED2 vytvořen společný soubor pro detekované taxony z podkmenů Glomeromycotina a Mucoromycotina. Pro každý vzorek byl odlišný počet cílových sekvencí, což bylo nevhodné pro následnou analýzu. Bylo tedy ke každému vzorku vybráno náhodně 800 sekvencí.

Data ze SEED2 byla uložena v programu MS Excel, kde byly odstraněny ready pod 0,5% hranicí z celkového počtu sekvencí. Dle MaarjAM databáze byly k jednotlivým skupinám přiřazeny názvy čeledí, případně druhu.

3.3.7.4 Statistické vyhodnocení

Výsledný soubor dat byl použit k popisu změn diverzity a složení společenstva AMF a FE v odpovědi na různé kombinace živin. Odpověď složení společenstva byla vyhodnocena v programu Canoco 5 (Ter Braak & Šmilauer 2012), kde pro všechny testované hypotézy byla použita metoda RDA (redundanční analýza).

Odpověď druhové diverzity měřené indexem N2 (Hill 1973), který představuje efektivní počet druhů, byla hodnocena pomocí analýzy variance. K porovnání intenzity kolonizace kořenů a složení společenstva byly v programu Canoco 5 (Ter Braak & Šmilauer 2012) taktéž provedeny analýzy RDA.

V programu R (R Core Team 2021) byl testován vliv jednotlivých hladin ošetření a druhu hostitelských rostlin na součet všech readů OTU FE. Použitou analýzou byla dvoucestná ANOVA.

Součet OTU FE byl korelován s kolonizací kořenů FE také v programu R (R Core Team 2021) Pearsonovým korelačním koeficientem. Data obou proměnných byla nejprve logaritmicky transformována.

3.4 Chemická analýza

3.4.1 Příprava biomasy

Byla provedena chemická analýza obsahu dusíku, uhlíku a fosforu v nadzemní biomase. Listy byly nejprve nastříhány na malé segmenty, z nich bylo odváženo 0,25–0,3 g pro každý vzorek. Biomasa byla následně mleta na oscilačním mlýnu Retsh 400 MM o frekvenci 29 Hz. Listy PA, PL a BO byly mlety po dobu 5 min, listy AO byly tvrdší, a tak mletí bylo prodlouženo na 9 min.

3.4.2 Analýza fosforu (FIA)

K analýze fosforu v pevných částech rostlin byla zvolena metoda průtokové injekční analýzy (FIA). Do zkumavek bylo odváženo 5–10 mg jemného prášku z každého vzorku (přesná navážka byla zaznamenána). K těmto zkumavkám byla připravena ještě 2 slepá stanovení a 6 standardů z roztoku KH_2P_4 o známé koncentraci.

Do všech zkumavek bylo přidáno 0,25 ml koncentrované HNO_3 . Otevřené nádoby byly na 30 min umístěny do mineralizačního bloku předehřátého na 115 °C. Když zchladly, bylo do nich přidáno 0,6 ml zředěné HClO_4 . Poté byly opět přesunuty do bloku, tentokrát nahřátého na 170 °C, kde byly 2 hodiny zahřívány až do úplného odbarvení. Po zchladnutí byly vzorky naředěny 10 ml redestilované vody a pevně uzavřeny. Zkumavky byly promíchány a ponechány 1 hodinu hydrolyzovat při 100 °C.

Z vychladlého a přes noc odstátého vzorku byly odebrány 2 ml do nové zkumavky. Do ní pak bylo přidáno 8 ml zředěné HClO_4 . Z tohoto pětkrát zředěného roztoku byla spektrofotometrem zjištěna koncentrace fosforu po mineralizaci [$\mu\text{g/l}$] a z ní spočítán obsah fosforu na 1 g vzorku.

Vypočítané hodnoty byly zaznamenány do programu MS Excel. Výstupem byly v programu R (R Core Team 2021) vytvořené Box-and-whiskers diagramy.

3.4.3 Analýza dusíku a uhlíku (TCD)

Obsah dusíku a uhlíku byl měřen teplotně vodivostním detektorem (TCD).

Na mikroanalytické váze byly naváženy v kovové kapsli přibližně 4 mg od každého vzorku. Přesná navážka každého vzorku byla zaznamenána. Prášek byl pinzetou pečlivě zabalen do kovu tak, aby se nevysypal. Do přístroje byly vzorky dávány v zaznamenaném pořadí.

Získané hodnoty obsahu byly zapsány do programu MS Excel. Výstupem byly v programu R (R Core Team 2021) vytvořené Box-and-whiskers diagramy.

4 Výsledky

4.1 Hostitelské rostliny

Výsledný stav rostlin před ukončením skleníkového pokusu ukazují Obr. 8 až Obr. 11. Hmotnost jejich nadzemní a kořenové biomasy po usušení shrnuje Tab. 2.

Tab. 2: Průměrné hmotnosti (g) nadzemní biomasy a biomasy kořenů pro jednotlivé zásahy (N – přidaný dusík, P – přidaný fosfor, NP – přidané obě živiny, 0 – kontrola) se směrodatnou odchylkou (SD).

| | | AO | | PA | | BO | | PL | |
|-----------------------|----|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|
| | | Průměr | SD | Průměr | SD | Průměr | SD | Průměr | SD |
| Biomasa listů | N | 1,90 | 0,20 | 0,20 | 0,07 | – | – | 1,58 | 0,61 |
| | P | 0,65 | 0,07 | 0,62 | 0,21 | 0,59 | 0,09 | 1,39 | 0,16 |
| | NP | 8,12 | 0,68 | 3,46 | 0,54 | 0,70 | 0,16 | 4,98 | 1,30 |
| | 0 | 0,61 | 0,05 | 0,18 | 0,02 | 0,24 | 0,03 | 0,99 | 0,11 |
| Biomasa kořenů | N | 1,07 | 0,09 | 0,06 | 0,03 | – | – | 0,47 | 0,17 |
| | P | 0,93 | 0,12 | 0,43 | 0,20 | 0,70 | 0,17 | 1,57 | 0,35 |
| | NP | 3,32 | 0,93 | 0,69 | 0,13 | 0,26 | 0,04 | 1,24 | 0,41 |
| | 0 | 0,64 | 0,07 | 0,08 | 0,02 | 0,19 | 0,03 | 0,74 | 0,08 |

Druh PL stihl vytvořit v kontrolním zásahu 1–3 květenství na květináč, v nádobách s přidaným dusíkem 2–9 a při ošetření oběma hnojivy 22–32. Rostliny hnojené samotným fosforem nezaložily květenství.

Při hnojení dusíkem byly zaznamenány úhyny semenáčků. Pro PL to znamenalo ztrátu jedné rostliny ve třech květináčích a dvou rostlin v jednom květináči. V případě BO nepřežila hnojení dusíkem ani jedna rostlina. Při kombinaci obou hnojiv BO nepřežila první hnojení, dosazené semenáčky se ale uchytily. Z nich po druhém hnojení uhynula jedna či dvě rostliny na květináč. U obou druhů trav přežil plný počet jedinců.



Obr. 8: Stav AO před ukončením pokusu. Rostliny jsou seřazeny do sloupců dle ošetření v pořadí kontrola, obě živiny, dusík, fosfor.



Obr. 9: Stav PA před ukončením pokusu. Rostliny jsou seřazeny do sloupců dle ošetření v pořadí kontrola, obě živiny, dusík, fosfor.



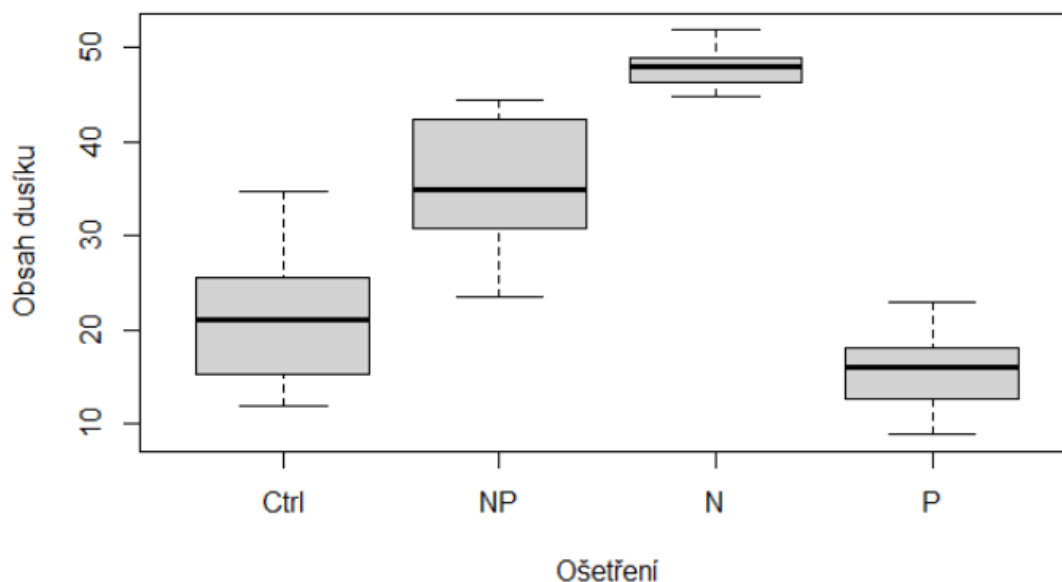
Obr. 10: Stav BO před ukončením pokusu. Rostliny jsou seřazeny do sloupců dle ošetření v pořadí kontrola, obě živiny, dusík, fosfor.



Obr. 11: Stav PL před ukončením pokusu. Rostliny jsou seřazeny do sloupců dle ošetření v pořadí kontrola, obě živiny, dusík, fosfor.

4.2 Chemické analýzy

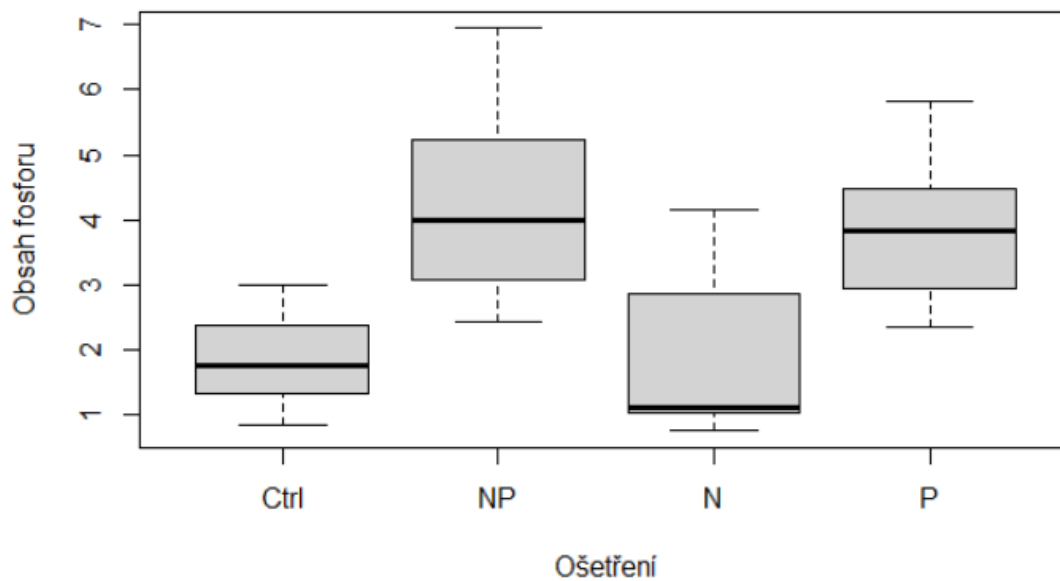
Jak lze vidět na Obr. 12, v rostlinách pohnojených samotným dusíkem byl jeho obsah největší v porovnání s ostatními druhy ošetření. Méně dusíku bylo ve vzorcích, ke kterým byly přidávány obě živiny, poté v kontrolních květináčích. Nejméně dusíku obsahovala nadzemní biomasa rostlin, kterým byl přidáván pouze fosfor.



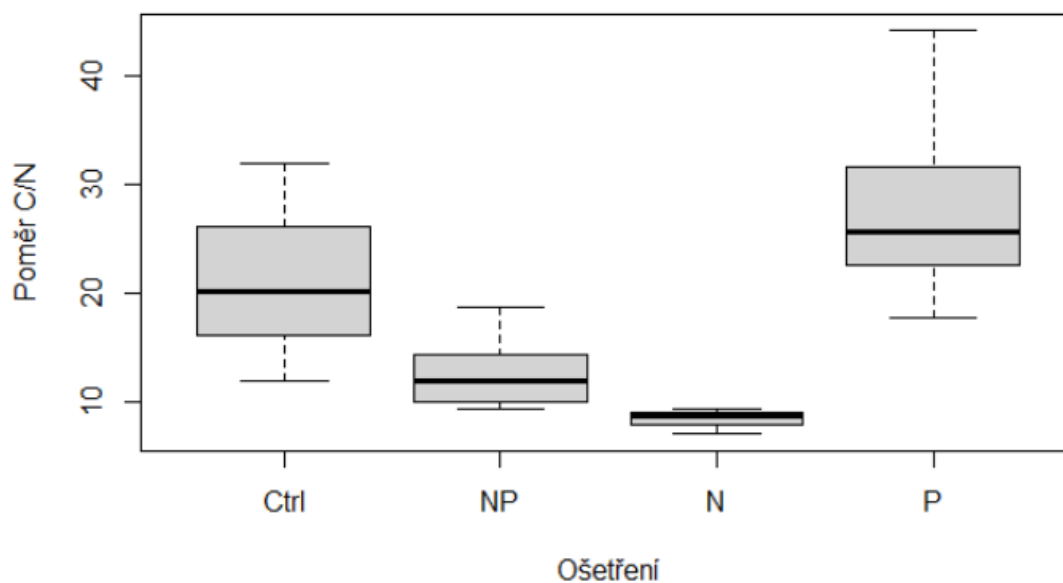
Obr. 12: Box-and-whiskers diagram zobrazující množství dusíku [mg] v g sušiny nadzemní biomasy v závislosti na jednotlivých ošetřeních. Ctrl – kontrola, NP – přidání obě živiny, N – přidání dusík, P – přidání fosfor.

Obr. 13 ukazuje, že největší obsah fosforu byl ve vzorcích, jež byly ošetřeny oběma hnojivy nebo fosforem. Výrazně méně fosforu bylo v kontrolních květináčích a v ošetření dusíkem.

Poměr C:N byl nejvyšší v ošetření fosforem. Hodnoty byly nižší v případě kontrolních vzorků a ve vzorcích s oběma přidávanými živinami. Nejmenší poměr byl zaznamenán po přidání dusíku do substrátu (Obr. 14).



Obr. 13: Box-and-whiskers diagram zobrazující množství fosforu [mg] v g sušiny nadzemní biomasy v závislosti na jednotlivých ošetřeních. Ctrl – kontrola, NP – přidané obě živiny, N – přidaný dusík, P – přidaný fosfor.



Obr. 14: Box-and-whiskers diagram zobrazující poměr uhlíku a dusíku v nadzemní biomase v závislosti na jednotlivých ošetřeních. Ctrl – kontrola, NP – přidané obě živiny, N – přidaný dusík, P – přidaný fosfor.

4.3 Intenzita kolonizace kořenů AMF a FE

Změny měřených parametrů mykorhizní kolonizace vlivem přidání dusíku a fosforu shrnuje Tab. 3.

Tab. 3: Výsledky analýz variance testujících vliv jednotlivých typů ošetření a příslušnosti ke druhu na zvolené charakteristiky mykorhizní kolonizace.

Ošetření: P – fosfor, N – dusík, * – interakce faktorů, DF – stupně volnosti testovaného členu modelu, p – dosažená hladina signifikance.

Residuální DF jsou u všech analýz rovny 56.

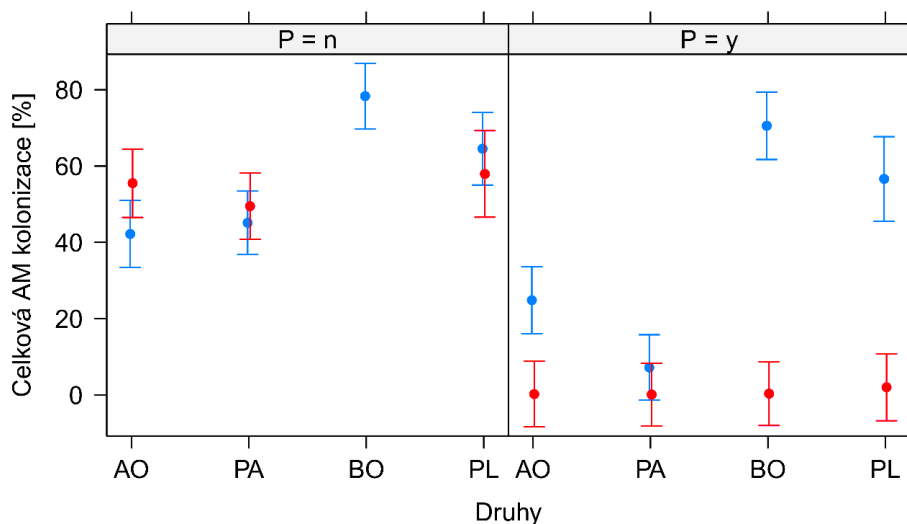
| Charakteristika | Faktor | DF | F | p |
|------------------------|---------------|-----------|----------|----------|
| Celková AM kolonizace | Blok | 4 | 0,5 | 0,758 |
| | N | 1 | 240,2 | <0,001 |
| | P | 1 | 310,2 | <0,001 |
| | Druh | 3 | 23,1 | <0,001 |
| | N*P | 1 | 131,9 | <0,001 |
| | N*Druh | 3 | 17,1 | <0,001 |
| | P*Druh | 3 | 4,1 | 0,010 |
| | N*P*Druh | 2 | 3,6 | 0,033 |
| Arbuskuly | Blok | 4 | 0,7 | 0,609 |
| | N | 1 | 152,9 | <0,001 |
| | P | 1 | 435,7 | <0,001 |
| | Druh | 3 | 20,6 | <0,001 |
| | N*P | 1 | 88,8 | <0,001 |
| | N*Druh | 3 | 13,8 | <0,001 |
| | P*Druh | 3 | 8,6 | <0,001 |
| | N*P*Druh | 2 | 4,2 | 0,020 |
| Vezikuly | Blok | 4 | 2,4 | 0,061 |
| | N | 1 | 261,9 | <0,001 |
| | P | 1 | 53,3 | <0,001 |
| | Druh | 3 | 44,6 | <0,001 |
| | N*P | 1 | 22,1 | <0,001 |
| | N*Druh | 3 | 26,2 | <0,001 |
| | P*Druh | 3 | 1,7 | 0,176 |
| | N*P*Druh | 2 | 3,8 | 0,029 |

| Charakteristika | Faktor | DF | F | p |
|-----------------|----------|----|-------|--------|
| FE | Blok | 4 | 1,7 | 0,166 |
| | N | 1 | 44,1 | <0,001 |
| | P | 1 | 303,8 | <0,001 |
| | Druh | 3 | 48,5 | <0,001 |
| | N*P | 1 | 86,3 | <0,001 |
| | N*Druh | 3 | 6,8 | <0,001 |
| | P*Druh | 3 | 4,0 | 0,012 |
| | N*P*Druh | 2 | 10,5 | <0,001 |

4.3.1 Celková kolonizace AM

Na celkovou míru kolonizace AMF má vliv jak hnojení fosforem či dusíkem, tak i samotná druhová příslušnost rostliny. Interakce uvedených faktorů byla taktéž signifikantní. Efekt bloků nebyl průkazný (Tab. 3).

Z Obr. 15 lze vyčíst, že samotné přidání fosforu mělo nepatrný vliv na kolonizaci AMF u dvouděložných rostlin oproti kontrolním (nehnojeným) rostlinám. Naproti tomu u trav byl zaznamenán zřetelný pokles celkové kolonizace AMF po přidání fosforu. Hlavní efekt dusíku je zde zapříčiněn zejména výrazným poklesem za současné aplikace fosforu. Bez přidaného fosforu byl vliv přidání dusíku nepatrný. Nejnižší, téměř nulová infekce byla zaznamenána ve všech rostlinách, které byly hnojeny jak fosforem, tak i dusíkem.



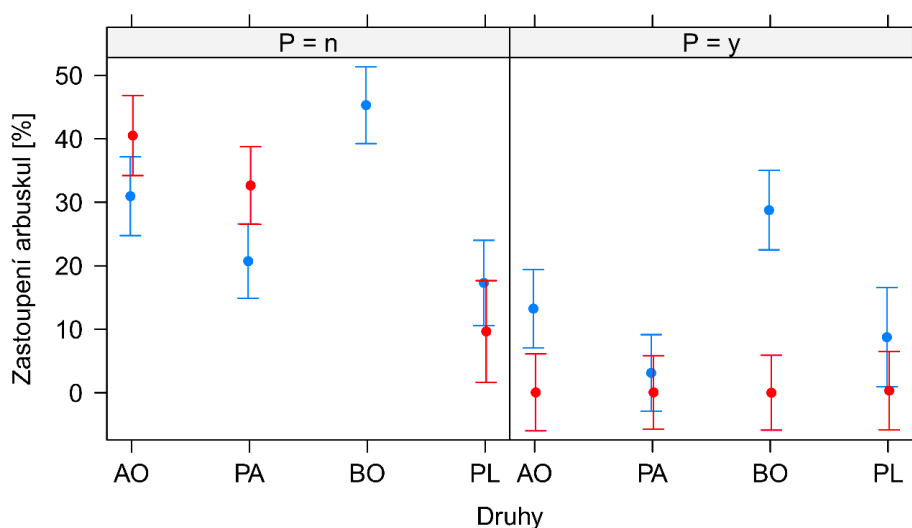
Obr. 15: Graf shrnující výsledky analýzy variance testující vliv ošetření a druhové příslušnosti na celkovou kolonizaci AM houbami. Zobrazené hodnoty jsou bez arcsinové transformace. Kromě průměrných hodnot (kolečka) jsou zobrazeny i 95% konfidenční intervaly.

Modrá – ošetření bez přidaného dusíku, červená – přidaný dusík, P = n – ošetření bez přidaného fosforu, P = y – přidaný fosfor.

4.3.2 Arbuskulární kolonizace

Stejně jako u celkové kolonizace AM houbami bylo prokázáno, že vliv na procentuální zastoupení arbuskul má hnojení fosforem či dusíkem, druhová příslušnost rostliny i kombinace uvedených faktorů. Efekt bloků byl neprůkazný (Tab. 3).

S přidáním fosforem kleslo oproti kontrole procentuální zastoupení arbuskul v kořenech trav i dvouděložných rostlin (Obr. 16). Kombinace hnojiv vedla k nejmenšímu výskytu arbuskul. Přidání samotného dusíku vedlo k zvýšení výskytu arbuskul u trav, ale ke snížení jejich zastoupení v PL.



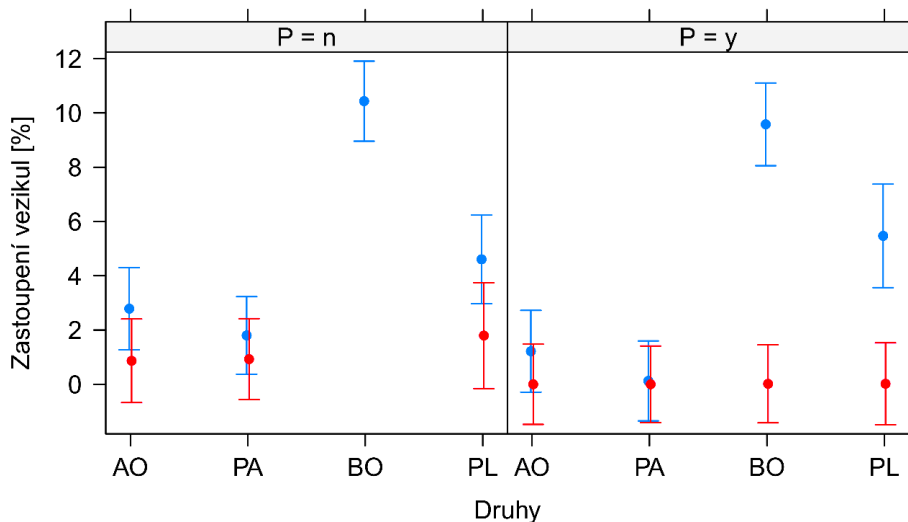
Obr. 16: Graf shrnující výsledky analýzy variance testující vliv ošetření a druhové příslušnosti na zastoupení arbuskul. Zobrazené hodnoty jsou bez arcsinové transformace. Kromě průměrných hodnot (kolečka) jsou zobrazeny i 95% konfidenční intervaly.

Modrá – ošetření bez přidání dusíku, červená – přidání dusíku, P = n – ošetření bez přidání fosforu, P = y – přidání fosforu.

4.3.3 Vezikulární kolonizace

V případě procentuálního zastoupení vezikul byl prokázán efekt dusíku, fosforu, druhové příslušnosti i interakcí většiny faktorů. Neprůkazná byla interakce vlivu fosforu a druhové příslušnosti a také – jako v ostatních případech – rozdíly mezi bloky (Tab. 3).

S přidáním samotným dusíkem zastoupení vezikul mírně pokleslo u trav i PL, ale pokles u dvouděložných druhů byl výrazný, pokud byl přidáván i fosfor. Nejvýraznější reakce na kombinaci dusíku a fosforu se projevila u BO (Obr. 17).



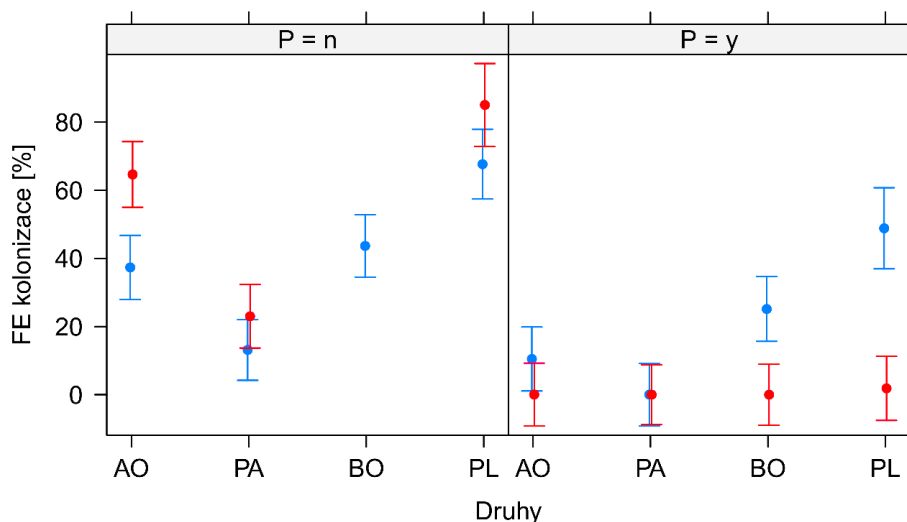
Obr. 17: Graf shrnující výsledky analýzy variance testující vliv ošetření a druhové příslušnosti na zastoupení vezikul. Zobrazené hodnoty jsou bez arcsinové transformace. Kromě průměrných hodnot (kolečka) jsou zobrazeny i 95% konfidenční intervaly.

Modrá – ošetření bez přidaného dusíku, červená – přidaný dusík, P = n – ošetření bez přidaného fosforu, P = y – přidaný fosfor.

4.3.4 Kolonizace FE

I pro kolonizaci FE byl prokázán vliv hnojení dusíkem i fosforem, vliv druhové příslušnosti rostlin a také interakce jednotlivých faktorů. Neprůkazný byl opět rozdíl mezi bloky (Tab. 3).

Obr. 18 ukazuje, že s přidáním fosforu se u všech druhů snížila kolonizace FE, a pokud byl přidán v kombinaci s dusíkem, byla kolonizace kořenů všech druhů téměř nulová. Pokud byl aplikován pouze dusík, kolonizace FE oproti kontrole mírně vzrostla.



Obr. 18: Graf shrnující výsledky analýzy variance testující vliv ošetření a druhové příslušnosti na kolonizaci FE. Zobrazené hodnoty jsou bez arcsinové transformace. Kromě průměrných hodnot (kolečka) jsou zobrazeny i 95% konfidenční intervaly.

Modrá – ošetření bez přidaného dusíku, červená – přidaný dusík, P = n – ošetření bez přidaného fosforu, P = y – přidaný fosfor.

4.4 Složení a diverzita společenstev zkoumaných hub

4.4.1 Společenstva AM hub

V kořenech všech druhů hostitelských rostlin bylo nalezeno celkem 43 VTX (Příloha 1, Příloha 2). Počet VTX v kořenech jednotlivých druhů v závislosti na typu hnojení shrnuje Tab. 4.

Tab. 4: Počet VTX v kořenech jednotlivých druhů a typech hnojení. N – přidaný dusík, P – přidaný fosfor, NP – přidané obě živiny.

| Druh | N | P | NP | Kontrola | Celkem |
|------------------------|----|----|----|----------|--------|
| <i>A. odoratum</i> | 15 | 20 | 26 | 17 | 32 |
| <i>P. angustifolia</i> | 15 | 22 | 32 | 20 | 38 |
| <i>B. officinalis</i> | – | 16 | 30 | 15 | 31 |
| <i>P. lanceolata</i> | 16 | 22 | 22 | 16 | 31 |

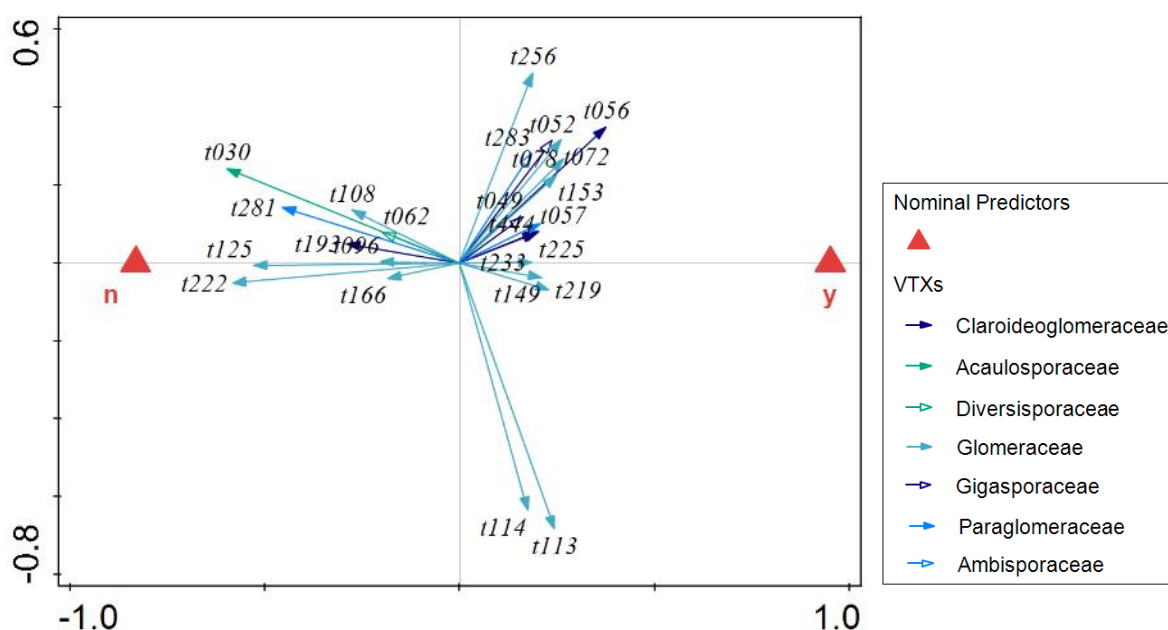
Rozdíl ve složení AMF společenstva oproti kontrole byl prokázán pro všechny typy hnojení (Tab. 5). Na Obr. 19 a Obr. 20 je zobrazeno 25 VTX, které nejlépe odpovídají na zkoumaný vliv hnojení N, resp. P. Zatímco na zvýšenou dostupnost N negativně reagovalo 9 ze 25 zobrazených nejvíce reagujících druhů, v případě P jich bylo jen 5, přičemž na obě živiny negativně reagovaly pouze taxony VTX 193 (z čeledi

Claroideoglomeraceae) a VTX 096 (z čeledi Glomeraceae). Patrná je také rozdílná preference taxonů VTX 113 a VTX 114, které na dodání N reagují pozitivně, ale na P negativně.

Tab. 5: Výsledky analýz RDA testujících vliv jednotlivých typů hnojení a vliv příslušnosti ke druhu hostitele na kompozici společenstva AM hub v kořenech rostlin.

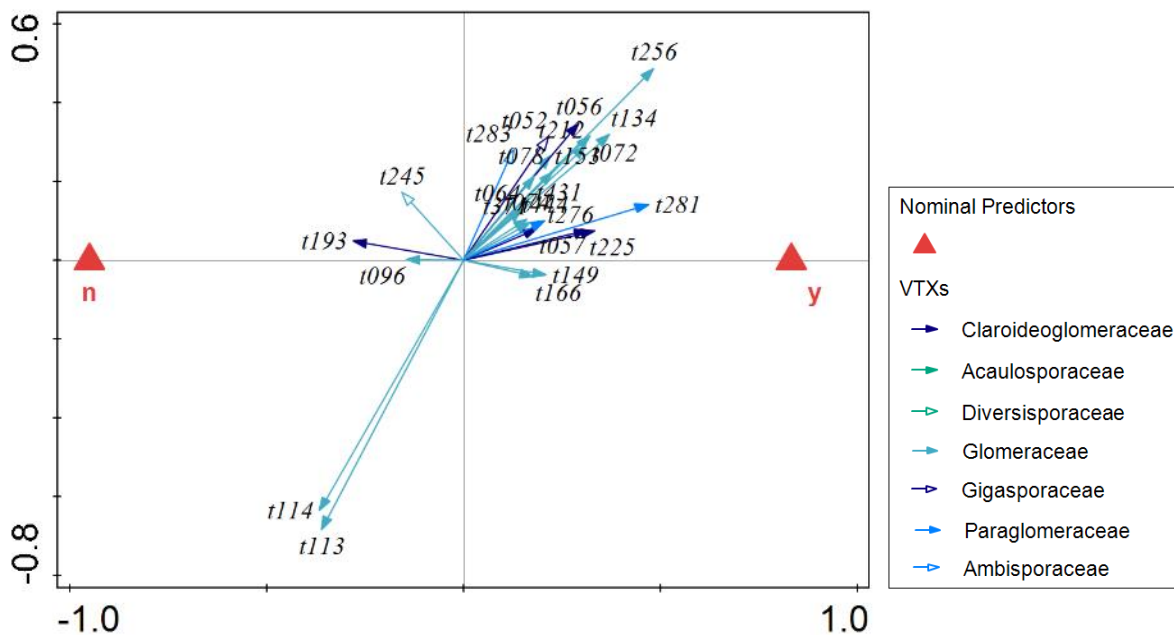
N – přidáný dusík, P – přidáný fosfor, NP – přidané obě živiny. F – hodnota F statistiky, p – dosažená hladina signifikance, R^2_{adj} – upravený koeficient determinace.

| Vysvětlující proměnná | F | p | R^2_{adj} |
|-----------------------|------|--------------|-------------|
| N | 10,5 | 0,001 | 12,54% |
| P | 7,1 | 0,001 | 8,44% |
| NP | 4,4 | 0,001 | 5,00% |
| Druh | 5,6 | 0,001 | 16,26% |



Obr. 19: Změna složení společenstva AM hub při hnojení dusíkem.

Červený trojúhelník uvádí, že dusík: n – nebyl přidán, y – byl přidán. Šipky reprezentují konkrétní VTX, jejich barva odpovídá jejich čeledi (viz legenda). Zobrazeno je pouze 25 VTX, jejichž zastoupení nejlépe odpovídá na přidání dusíku. Dodání této živiny vysvětluje 9,3% celkové variability společenstva.

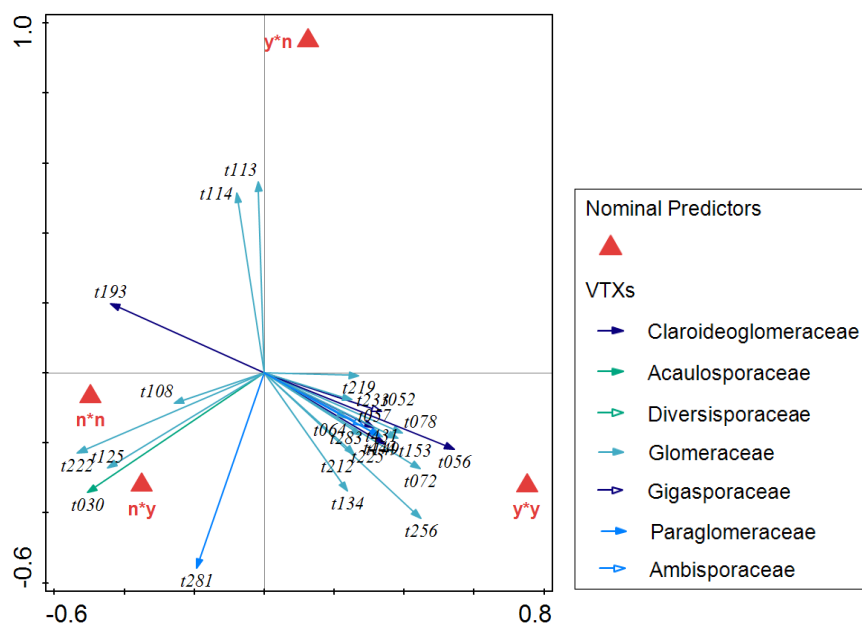


Obr. 20: Změna složení společenstva AM hub při hnojení fosforem.

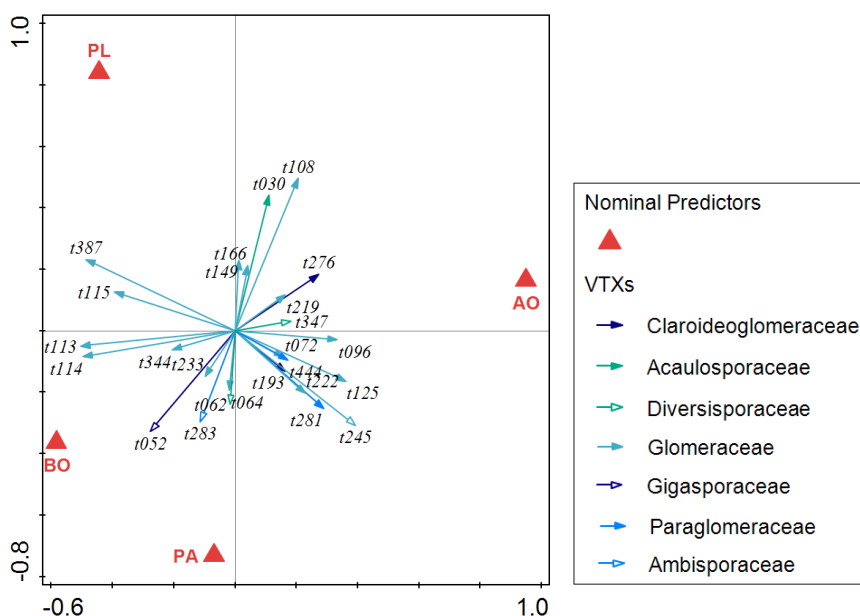
Červený trojúhelník uvádí, že fosfor: n – nebyl přidán, y – byl přidán. Šipky reprezentují konkrétní VTX, jejich barva odpovídá jejich čeledi (viz legenda). Zobrazeno je pouze 25 VTX, jejichž zastoupení nejlépe odpovídá na přidání fosforu. Dodání této živiny vysvětluje 6,0% celkové variability.

Komplexnější pohled nabízí Obr. 21. Ten ukazuje, že společenstvo AMF (zde zastoupené opět pouze 25 VTX nejlépe odpovídajícími na přidání hnojiv) se po přidání fosforu příliš neliší od kontrolních květináčů. Výraznější rozdíl nastává až v případě kombinace obou hnojiv. Na samotný dusík reagují výrazně pozitivně dva taxony VTX 113 a 114, oba reprezentující *Rhizophagus irregularis*. Většina taxonů (17 ze zobrazených 25) s přidáním obou živin zvýšila své relativní zastoupení.

Složení společenstev AMF se liší v kořenech jednotlivých druhů hostitelských rostlin (Tab. 5). Z 25 VTX nejlépe odpovídajících na druh hostitelské rostliny se podobné druhové složení objevuje u rostlin BO a PA, jak můžeme vidět na Obr. 22. V kořenech PL se vyskytovaly především VTX z čeledi Glomeraceae, naopak v AO byla největší bohatost čeledí AMF.



Obr. 21: Změna složení společenstva AM hub při různé kombinaci obou hnojiv. Červený trojúhelník uvádí, že: n*n – nebylo přidáno žádné hnojivo, n*y – ošetření fosforem, y*n – ošetření dusíkem, y*y – kombinace hnojiv. Šipky reprezentují konkrétní VTX, jejich barva odpovídá jejich čeledi (viz legenda). Zobrazeno je pouze 25 VTX, jejichž zastoupení nejlépe odpovídá na přidání obou hnojiv. Dodání živin vysvětluje 18,7% celkové variability.



Obr. 22: Složení společenstva AM hub v kořenech jednotlivých druhů rostlin. Červený trojúhelník odpovídá průměrnému složení společenstva pro rostliny daného hostitelského druhu. Šipky reprezentují konkrétní VTX, jejich barva odpovídá jejich čeledi (viz legenda). Zobrazeno je pouze 25 VTX, jejichž zastoupení je nejlépe vysvětleno hostitelským druhem. Tato proměnná vysvětluje 13,0% celkové variability.

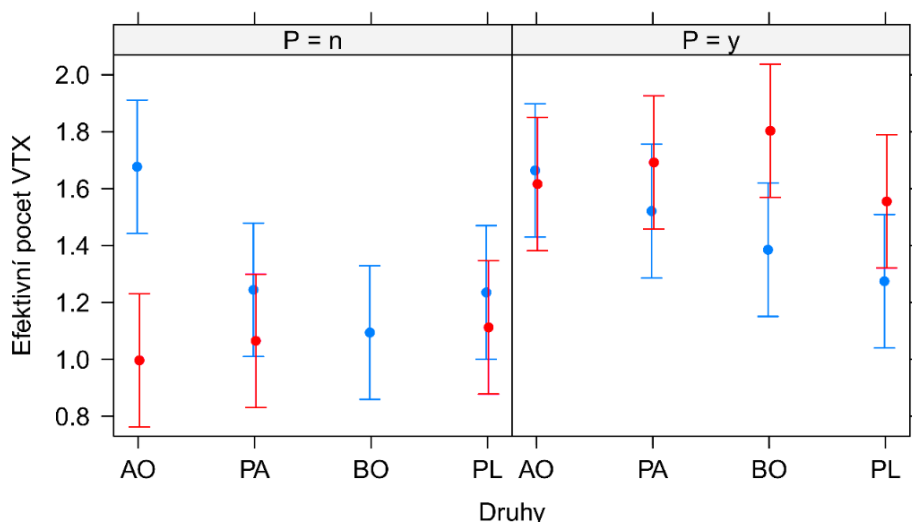
4.4.1 Diverzita společenstva

Na efektivní počet VTX měly průkazný vliv hnojení fosforem, interakce vlivu obou hnojiv a interakce přidaného dusíku s druhovou příslušností rostliny (Tab. 6). Ostatní faktory a jejich interakce nebyly průkazné.

Tab. 6: Výsledky analýz variance testujících vliv jednotlivých typů hnojení, příslušnosti ke druhu a rozdílů mezi bloky na diverzitu společenstva mykorhizních hub. Byla provedena logaritmická transformace efektivního počtu VTX. Ošetření: P – fosfor, N – dusík, * – interakce faktorů, DF – stupně volnosti testovaného členu modelu, p – dosažená hladina signifikance.

| Faktor | Df | F | p |
|---------------|-----------|----------|------------------|
| Blok | 4 | 2,2 | 0,079 |
| N | 1 | 0,1 | 0,748 |
| P | 1 | 38,0 | <0,001 |
| Druh | 3 | 2,0 | 0,122 |
| N*P | 1 | 16,1 | <0,001 |
| N*Druh | 3 | 4,8 | 0,0043 |
| P*Druh | 3 | 1,0 | 0,414 |
| N*P*Druh | 2 | 0,4 | 0,645 |

Přidání fosforu mělo za následek zvýšení efektivního počtu taxonů u PA a BO (Obr. 23). V případě současného přidávání dusíku byl efekt fosforu výraznější (kromě AO) a projevil se i u PL. Hnojení samotným dusíkem vedlo k výraznému snížení diverzity u druhu AO.



Obr. 23: Graf zobrazující výsledky analýzy variance testující vliv ošetření a druhové příslušnosti na index diverzity (N_2). Na svislé ose jsou vyneseny logaritmované hodnoty efektivního počtu VT_X. Modrá – ošetření bez přidaného dusíku, červená – přidaný dusík, P = n – ošetření bez přidaného fosforu, P = y – přidaný fosfor.

4.4.2 Společenstva FE

V kořenech hostitelských rostlin se dohromady nacházely 4 OTU, jež patřily k morfotypům FE (Orchard et al. 2017). Všechny byly určeny jako potenciální druhy z čeledi Endogonaceae. Jeden z klasifikovaných OTU silně dominoval. Nacházel se ve všech hostitelských rostlinách při jakémkoli typu zásahu, také počet jeho readů byl ve vzorcích výrazně vyšší než u ostatních. Zbývající tři OTU se vyskytovaly pouze v některých vzorcích.

Byl testován vliv hnojení a druhu hostitelské rostliny na součet readů OTU spadajících pod podkmen Mucoromycotina identifikovaná s FE, avšak ani jeden ze zkoumaných vlivů nebyl průkazný (Tab.7).

Tab. 7: Výsledky analýz variance testujících vliv jednotlivých hladin ošetření a příslušnosti ke druhu na počet readů OTU FE.

Ošetření: P – fosfor, N – dusík, * – interakce faktorů, DF – stupně volnosti testovaného členu modelu (residuální DF jsou u všech analýz rovny 56), p = dosažená hladina signifikance.

| Faktor | DF | F | p |
|---------------|-----------|----------|----------|
| Blok | 4 | 0,863 | 0,492 |
| N | 1 | 0,161 | 0,690 |
| P | 1 | 0,128 | 0,722 |
| Druh | 3 | 0,837 | 0,479 |
| N*P | 1 | 0,405 | 0,527 |
| N*Druh | 3 | 1,395 | 0,254 |
| P*Druh | 3 | 0,209 | 0,889 |
| N*P*Druh | 2 | 1,514 | 0,229 |

4.5 Porovnání intenzity kolonizace kořenů a složení společenstva

V RDA nebyla prokázána souvislost mezi celkovou ani arbuskulární kolonizací a složením společenstva AMF (Tab. 8).

Taktéž korelace počtu readů OTU podkmene *Mucoromycotina* s kolonizací FE v kořenech hostitelských rostlin nebyla průkazná ($t = -0,624$, $DF = 73$, $p = 0,535$).

Tab. 8: Výsledky analýz RDA testujících souvislost kolonizace kořenů rostlin AMF a kompozice jejich společenstva.

F – hodnota F statistiky, p – dosažená hladina signifikance, R^2_{adj} – upravený koeficient determinace.

| Kolonizace | F | p | R^2_{adj} |
|------------------------|----------|----------|-------------------------------|
| Arbuskulární | 0,5 | 0,915 | 0,00% |
| Celková | 0,7 | 0,755 | 0,00% |
| Arbuskulární + celková | 0,7 | 0,894 | 0,00% |

5 Diskuse

Všechny sledované kvantitativní charakteristiky kolonizace AMF byly nejnižší při společném přidávání obou živin (Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17). Jak předpokládala hypotéza H1, přidal-li se samotný fosfor, celková infekce se zmenšila. Pokles celkové kolonizace AMF po přidání fosforu může být zapříčiněn tím, že rostliny omezí alokaci uhlíku svým symbiontům (Bennett & Groten 2022). Intenzivnější přenos a spolupráce mezi rostlinou a houbou funguje při nižší koncentraci fosforu v půdě (Egerton-Warburton et al. 2007; Bever 2015).

V souladu s hypotézou H2 byl tento trend výraznější u jednoděložných hostitelských druhů, podobně jako to pozorovali Šmilauer et al. (2021). Reakce společenstva AMF zároveň odpovídá zjištění Unger et al. (2016), že trávy více spoléhají na svůj kořenový systém než dvouděložné rostliny, jež lze považovat za mykorhizní strategy. Z hlediska arbuskulární kolonizace byl zaznamenán pokles u všech hostitelských druhů bez ohledu na to, do jaké skupiny patří.

Zvýšené množství samotného dusíku v půdě vedlo k vyššímu výskytu arbuskul u trav, a naopak menšímu u PL (Obr. 16). To by nasvědčovalo tomu, že při zvýšeném poměru dusíku ku fosforu v půdě jsou trávy schopné pružněji reagovat nejen zvýšenou celkovou kolonizací svých kořenů, ale i specifickým navýšením množství míst přenosu živin – arbuskul.

Pro vezikulární kolonizaci byl pokles při zvýšené dostupnosti dusíku zaznamenán u všech druhů (Obr.17). Všechny skupiny AMF tvoří vezikuly (van Aarle & Olsson 2003). Je tak obtížné rozhodnout, jakou roli v tom hraje změna v množství organických látek poskytnutých houbě hostitelem a jakou změna druhového složení společenstva.

Také pro FE kolonizaci byl průkazný vliv všech typů hnojení i druhu hostitelské rostliny (Obr. 18). I tato skupina hub vykazovala nejmenší procento infekce, pokud byly přidány fosfor i dusík zároveň. Samotný fosfor měl za následek snížení kolonizace FE u všech druhů hostitelů. Naopak přidání samotného dusíku vedlo konzistentně k mírnému zvýšení kolonizace FE.

Tato odlišná reakce FE kolonizace na dusík by mohla být vysvětlena odlišností efektů symbiózy s FE a AMF. Například Field et al. (2019) zjistili (pro symbiotické játrovky) větší roli FE symbiontů v získávání dusíku pro svého hostitele a poněkud vyšší účinnost AMF při získávání fosforu.

Co se týká společenstva AMF, z nalezených 43 VTX byly nejčastější čeledi Glomeraceae s 25 VTX a Claroideoglomeraceae se 7 VTX (Příloha 1, Příloha 2). Stejně tomu bylo ve studii Šmilauer et al. (2020a), která probíhala na stejné lokalitě, ze které pocházela půda použitá v této práci. Autoři se zabývali funkčními vlastnostmi jednotlivých VTX, konkrétně otázkou, jak rychle jsou houby schopny kolonizovat nový prostor (foraging speed) a do jaké míry rozlišují místa s vysokou a nízkou koncentrací živin (foraging precision). Bylo zjištěno, že konkrétně čeleď Glomeraceae nekolonizuje cílové oblasti tak rychle, ale přesněji vyhledává oblasti bohaté na živiny. U čeledi Claroideoglomeraceae tomu bylo naopak. Ostatní čeledi byly tak málo zastoupeny, že odhady se nedají vztáhnout na celou skupinu.

Zároveň bylo zjištěno, že VTX, které je možno kultivovat, měly spíše nadprůměrnou foraging speed a foraging precision. Příkladem mohou být VTX 113 a VTX 114, které spadají pod morfotyp *R. irregularis* (Öpik et al. 2010). Taxon, který Sýkorová et al. (2007) klasifikovali jako generalistu, se v mé práci vyskytoval zejména u rostlin ošetřených dusíkem. Šmilauer et al. (2020a) u těchto VTX zjistili foraging speed větší než u většiny ostatních VTX z čeledi Glomeraceae.

Z toho plyne, že *R. irregularis* dokáže rychle osidlovat nově dostupná místa včetně těch, která jsou bohatá na živiny. Zároveň je schopen získat fosfor ze vzdáleností až 10 cm od kořene hostitelské rostliny (Jansa et al. 2005). To z něj dělá potenciálně nejúspěšnějšího symbionta pro rostlinu, která mu tak preferenčně alokuje uhlík (Bever 2015). Tím se tento taxon mohl stát dominantou v kořenech rostlin hnojených samotným dusíkem. Zároveň toto ošetření zapříčinilo pokles efektivního počtu VTX, zvláště u AO.

Hypotéza H3 předpokládala pokles diverzity ve vzorcích hnojených fosforem, protože bylo očekáváno vyšší zastoupení čeledi Glomeraceae a menší zastoupení ostatních (Treseder et al. 2018; Egerton-Warburton et al. 2007). Získaná data ale dominanci jedné čeledi neprokázala (Obr. 20). Přidání fosforu zároveň mělo za následek zvýšení počtu druhů AMF (Tab. 4), přestože Egerton-Warburton et al. (2007) při zvýšené koncentraci této živiny narazili na nejméně rozmanité společenstvo. Hypotéza tak byla zamítnuta.

Rozdílné výsledky může mít na svědomí odlišná metoda sběru dat. Egerton-Warburton et al. (2007) odvozovali skladbu společenstva ze zastoupení spor v půdě a ne z molekulární analýzy. Jejich výsledky tak mohly více odrážet pouze sníženou sporulaci AMF v důsledku hnojení.

Ještě více taxonů se objevilo ve vzorcích, jež byly z květináčů s oběma hnojivy (Tab. 4, Obr. 21). Počet VTX se zvýšil u PA, PL a nejvýrazněji u BO. Avšak pro 19 z 20 takto ošetřených vzorků platilo, že koncentrace DNA byla nízká, a z toho důvodu množství PCR cyklů bylo navýšeno na 35 (u ostatních vzorků toto bylo provedeno pouze 1x v případě přidaného fosforu a 1x u dusíku).

Šmilauer et al. (2020b) zaznamenali výrazný rozdíl mezi jedno- a dvouděložnými druhy jak ve složení společenstva AMF, tak v jeho diverzitě. Ve své studii se zabývali mimo jiné i třemi rostlinnými druhy shodnými s touto prací. Konkrétně to byly AO, BO a PL. Jejich výsledky ukazovaly vysokou podobnost mezi druhy BO a PL. Oproti tomu výsledky této práce ukazují větší podobnost druhů PA a BO (Obr. 22), tedy napříč skupinami jedno- a dvouděložných. Taxonomicky nejbohatší AMF společenstvo bylo u AO. Tato rostlina patřící do jednoděložných rostlin stejné bohatství AMF v článku Šmilauer et al. (2020b) neprojevila. Naopak – největší druhová bohatost byla u dvouděložných rostlin. Ke stejným výsledkům jako Šmilauer et al. (2020b) došli také Davison et al. (2020), kteří rovněž uvádějí, že čeleď Claroideoglomeraceae se vyskytuje více v jednoděložných a čeledi Glomeraceae a Diversisporaceae a Gigasporaceae ve dvouděložných rostlinách. Ačkoli v mojí práci dominovala v kořenech PL čeleď Glomeraceae (Obr. 22), nelze trend z předchozí studie přenést v plném rozsahu.

Porovnání míry kolonizace AMF a složení společenstva přineslo zajímavou otázku. Zatímco ve vzorcích s přidaným dusíkem i fosforem byla kolonizace téměř nulová, objevovalo se zde nejvíce VTX (Obr. 15 a Obr. 16). Proč tomu tak bylo, může vysvětlovat výše zmíněné tvrzení Bever (2015), že účinnější symbiont dokáže vykonkurovat ostatní houby. V květináčích s nedostatkem jedné živiny (tedy s přidaným dusíkem nebo fosforem) nebo obou živin (kontrolní květináče) rostliny podporovaly nejúčinnější symbionty (např. *R. irregularis* v kořenech, které rostly v substrátu s přidaným dusíkem). Rostliny tak nepodporovaly symbiózu s jinými, méně přínosnými houbami. Při aplikaci obou živin rostliny omezily přísun uhlíku všem symbiontům. Žádný druh tak nedominoval a AMF se v kořenech vyskytovaly jen v počátečních stádiích kolonizace v podobě hyf. Také Liu et al. (2015) vysvětlovali nárůst rodů AMF při vyšší koncentraci dusíku i fosforu poklesem dominantního rodu *Glomus*.

Alternativně mohlo jít o taxony vyskytující se pouze na povrchu kořenů, které do symbiózy vůbec nevstoupily. Jednalo by se tak o taxony, které se v minoritním množství

mohly vyskytovat i na kořenech rostlin v jiných ošetřeních, kde ale byly zastíněny dominantními taxony Bever (2015).

Během interpretace dat ze všech vzorků, tedy bez ohledu na aplikované ošetření, je nutno brát v potaz problematiku sekvenačního biasu. Poměr readů ve výsledném souboru dat nemusí odpovídat realitě, zejména na drobnějších taxonomických úrovních (Egan et al. 2018).

Hledání korelace mezi kolonizací a složením společenstva dopadlo neprůkazně pro AMF i FE (Tab. 8). Nebyl nalezen žádný vztah mezi těmito dvěma přístupy. Plyne z toho, že mikroskopické vyhodnocení a NGS sekvenování přináší dva nezávislé pohledy. Je proto velmi vhodné provádět je ve studiích mykorhizních symbiontů oba (Gamper et al. 2008; Orchard et al. 2016; Vierheilig et al. 2005).

Všechny OTU definované jako FE spadají dle databáze SILVA (Quast et al. 2013) mezi nepopsané druhy z čeledi Endogonaceae. Vliv hnojení a druhu rostliny na složení jejich společenstva nebyl průkazný, ač Orchard et al. (2016) zjistili, že výskyt FE závisí na hostitelské rostlině. Výsledky v této práci mohly být zkresleny malým počtem FE taxonů. Právě přesné určení počtu OTU je ovlivněno zvolenou metodikou analýzy dat (Albornoz et al. 2021).

Při interpretaci získaných výsledků je důležité mít na paměti, že složení FE i AMF společenstva bylo do značné míry ovlivněno tím, že se jedná o skleníkový pokus. Diverzita může být ovlivněna více metodou kultivace než rozdílem v hostitelské rostlině (Sýkorová et al. 2007). Na společenstvo AMF má vliv i zapojení hostitelské rostliny do porostu a interakce jejích kořenů s okolními jedinci (Zhang et al. 2022).

6 Závěr

Mykorrhizní symbióza u lučních rostlin je mimo jiné ovlivněna dostupností fosforu i dusíku. Nejvýraznější reakce se projevila po přidání obou hnojiv do půdy k hostitelským rostlinám. AMF i FE kolonizace byla téměř nulová, ačkoli taxonomická diverzita byla největší. Separátně měly živiny odlišné účinky i v závislosti na druhové příslušnosti hostitelské rostliny.

V kořenech, jež rostly v substrátu se samotným fosforem, poklesla celková AMF infekce – u jednoděložných rostlin výrazněji. Menší procento kolonizace neznamenovalo menší počet VTX, stejně jako v případě obohacování oběma hnojivy. Zvýšený obsah dusíku v půdě měl za následek větší výskyt arbuskul u trav, a naopak menší u PL. Společenstvo VTX zde ustoupilo dominantnímu druhu *R. irregularis*, který rychle kolonizuje místa bohatá na živiny.

I nepřilíš prozkoumaná symbiotická skupina FE reagovala odlišně na jednotlivé živiny. Přidání samostatného fosforu znamenalo stejně jako u AMF pokles kolonizace. Naproti tomu přidání pouze dusíku zapříčinilo její mírný nárůst.

Z výše zmíněných informací plyne, že pro poznání společenstva symbiotických hub je důležité zkoumat jak procentuální kolonizaci pod mikroskopem, tak složení společenstva molekulárními metodami. Oba přístupy ukazují chování AMF i FE jiným způsobem a nabízí dva nezávislé pohledy.

Tato práce přináší data o AM získaná pěstováním rostlin ve skleníku. Interakce kořenů rostlin a jiné podmínky, které se přirozeně na louce vyskytují, mohou na společenstvo hub působit jinak než zvolená metoda kultivace. V dalším výzkumu by bylo tedy vhodné zaměřit se na efekt dusíku a fosforu na společenstvo AMF a FE v terénu.

7 Literatura

- Albornoz FE, Orchard S, Standish RJ et al. 2021. Evidence for niche differentiation in the environmental responses of co-occurring Mucoromycotinian fine root endophytes and Glomeromycotinian arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Ecology*, 81, 864–873.
- Antunes PM, Lehmann A, Hart MM et al. 2012. Long-term effects of soil nutrient deficiency on arbuscular mycorrhizal communities. *Functional Ecology*, 26, 532–540.
- Bennett AE & Groten K. 2022. The costs and benefits of plant–arbuscular mycorrhizal fungal interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 73, 649–672.
- Bever JD. 2015. Preferential allocation, physio-evolutionary feedbacks, and the stability and environmental patterns of mutualism between plants and their root symbionts. *New Phytologist*, 205(4), 1503–1514.
- Boeraeve M, Honnay O & Jacquemyn H. 2019. Local abiotic conditions are more important than landscape context for structuring arbuscular mycorrhizal fungal communities in the roots of a forest herb. *Oecologia*, 190, 149–157.
- Brundrett MC. 2017. Global diversity and importance of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants. Biogeography of mycorrhizal symbiosis. Ecological studies, vol 230. Springer, Cham, ISBN978-3-319-56363-3.
- Davison J, Garcia de Leon D, Zobel M et al. 2020. Plant functional groups associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*, 226(4), 1117–1128.
- Dickson S, Smith FA & Smith SE. 2007. Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next?. *Mycorrhiza*, 17, 375–393.
- Delevaux CS, Smith-Ramesh LM & Kuebbing SE. 2017. Beyond nutrients: a meta-analysis of the diverse effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plants and soils. *Ecology*, 98(8), 2111–2119.
- Doyle JJ & Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*.
- Egan CP, Rummel A, Kokkoris V et al. 2018. Using mock communities of arbuscular mycorrhizal fungi to evaluate fidelity associated with Illumina sequencing. *Fungal Ecology*, 33, 52–64.

- Egerton-Warburton LM, Johnson NC & Allen EB. 2007. Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecological monographs*, 77(4), 527–544.
- Ezawa T, Smith SE & Smith F A. 2002. P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil*, 244, 221–230.
- Field KJ & Pressel S. 2018. Unity in diversity: structural and functional insights into the ancient partnerships between plants and fungi. *New Phytologist*, 220(4), 996–1011.
- Field KJ, Bidartondo MI, Rimington WR et al. 2019. Functional complementarity of ancient plant-fungal mutualisms: contrasting nitrogen, phosphorus and carbon exchanges between Mucoromycotina and Glomeromycotina fungal symbionts of liverworts. *New Phytologist*, 223, 908–921.
- Gamper HA, Young JPW, Jones DL & Angela Hodge. 2008. Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance?. *Fungal Genetics and Biology*, 45(5), 581–596.
- Goto BT & Maia LC. 2006. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. *Mycotaxon*, 96(4), 129–132.
- Hart MM, Aleklett K, Chagnon P-L et al. 2015. Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 207, 235–247.
- Hill MO. 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54, 427–432.
- Chagnon P-L & Bradley RL. 2013. Evidence that soil nutrient stoichiometry controls the competitive abilities of arbuscular mycorrhizal vs. root-borne non-mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, 6, 557–560.
- Chagnon PL, Bradley RL, Maherali H & Klironomos JN. 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science*, 18(9), 484–491.
- Jach-Smith LC & Jackson RD. 2020. Inorganic N addition replaces N supplied to switchgrass (*Panicum virgatum*) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecological Applications*, 30, e02047.

- Janoušková M, Puschel D, Hujslová M et al. 2015. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungal DNA in roots: how important is material preservation?. *Mycorrhiza*, 25, 205–214.
- Jansa J, Mozafar A & Frossard E. 2005. Phosphorus acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal community of a single field site. *Plant Soil*, 276, 163–176.
- Johnson NC. 2010. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*, 185, 631–647.
- Klironomos JN. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(9), 2292–2301.
- López-Ráez JA, Charnikhova T, Fernández I et al. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 168(3), 294–297.
- Ohsowski BM, Zaitsoff PD, Öpik M & Hart MM. 2014. Where the wild things are: looking for uncultured Glomeromycota. *New Phytologist*, 204, 171–179.
- Orchard S, Hilton S, Bending GD et al. 2017. Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. *New Phytologist*, 213(2), 481–486.
- Orchard S, Standish RJ, Nicol D et al. 2016. The response of fine root endophyte (*Glomus tenue*) to waterlogging is dependent on host plant species and soil type. *Plant and Soil*, 403, 305–315.
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E et al. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in AM fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188, 223–241.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(D1), D590–D596.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Sato K, Suyama Y, Saito M & Sugawara K. 2005. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassland Science*, 51, 179–181.
- Sinanaj B, Hoysted GA, Pressel S et al. 2021. Critical research challenges facing Mucoromycotina ‘fine root endophytes’. *New Phytologist*, 232, 1528–1534.

- Šmilauer P, Košnar J, Kotlínek M & Šmilauerová M. 2020a. Contrasting effects of host identity, plant community, and local species pool on the composition and colonization levels of arbuscular mycorrhizal fungal community in a temperate grassland. *New Phytologist*, 225, 461–473.
- Šmilauer P, Šmilauerová M, Kotlínek M & Košnar J. 2020b. Foraging speed and precision of arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions: An experimental approach. *Molecular Ecology*, 29, 1574–1587.
- Šmilauer P, Šmilauerová M, Kotlínek M et al. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungal communities of forbs and C3 grasses respond differently to cultivation and elevated nutrients. *Mycorrhiza*, 31, 455–470.
- Štajerová K, Šmilauerová M & Šmilauer P. 2009. Arbuscular mycorrhizal symbiosis of herbaceous invasive neophytes in the Czech Republic. *Preslia*, 81, 341–355.
- Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A & Redecker D. 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza*, 18, 1–14.
- Symbiom. 2021. Mykorhizní přípravky. *Symbiom* [online]. [cit. 2023-12-06] URL: <https://www.symbiom.cz/standardni-produkty>.
- Ter Braak CJF & Šmilauer P. 2018. Canoco reference manual and user's guide: software for ordination (version 5.10). *Microcomputer Power*, Ithaca, USA, 536.
- Treseder KK, Allen EB, Egerton-Warburton LM et al. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi as mediators of ecosystem responses to nitrogen deposition: A trait-based predictive framework. *Journal of Ecology*, 106, 480–489.
- Unger S, Friede M, Hundacker J et al. 2016. Allocation trade-off between root and mycorrhizal surface defines nitrogen and phosphorus relations in 13 grassland species. *Plant and Soil*, 407, 279–292.
- van Aarle IM & Olsson PA. 2003. Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6762–6767.
- Vandenkoornhuysen P, Leyval C & Bonnin I. 2001. High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity*, 87(2), 243–253.
- van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA & Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205, 1406–1423.

- Vasar M, Andreson R, Davison J et al. 2017. Increased sequencing depth does not increase captured diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 27, 761–773.
- Větrovský T, Baldrian P & Morais D. 2018. SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, 34(13), 2292–2294.
- Větrovský T, Kolaříková Z, Lepinay C et al. 2023. GlobalAMFungi: a global database of arbuscular mycorrhizal fungal occurrences from high-throughput sequencing metabarcoding studies. *New Phytologist*, 240, 2151–2163.
- Vierheilig H, Schweiger P & Brundrett M. 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum*, 125, 393–404.
- Yang H, Zhang Q, Koide RT et al. 2017. Taxonomic resolution is a determinant of biodiversity effects in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology*, 105(1), 219–228.
- Zhang Q, Koide RT, Liu J et al. 2022. Intraspecific plant interaction affects arbuscular mycorrhizal fungal species richness. *Plant and Soil*, 470, 141–152.

8 Přílohy

Příloha 1: Seznam nalezených čeledí a do nich spadajících VTX.

| Čeď VTX | Počet VTX | Název VTX |
|-----------------------------|------------------|--|
| Acaulosporaceae | 2 | VTX00030, VTX00231 |
| Ambisporaceae | 1 | VTX00283 |
| Archaeosporaceae* | 1 | VTX00245 |
| Claroideoglomeraceae | 7 | VTX00193, VTX00225, VTX00276, VTX00056, VTX00057, VTX00055, VTX00340 |
| Diversisporaceae | 2 | VTX00347, VTX00062 |
| Gigasporaceae | 2 | VTX00052, VTX00049 |
| Glomeraceae | 25 | VTX00113, VTX00108, VTX00387, VTX00114, VTX00222, VTX00256, VTX00115, VTX00072, VTX00219, VTX00212, VTX00134, VTX00125, VTX00078, VTX00431, VTX00371, VTX00166, VTX00344, VTX00153, VTX00096, VTX00149, VTX00233, VTX00074, VTX00064, VTX00117, VTX00457 |
| Paraglomeraceae | 3 | VTX00281, VTX00444, VTX00308 |
| Součet VTX | 43 | |

Příloha 2: Seznam VTX a jejich morfotypů. Zobrazen je počet vzorků, ve kterých se nacházeli a počet readů jednotlivých VTX napříč všemi vzorky.

| VTX | Zkratka | Morfotypy | Čeleď | Počet vzorků | Součet readů |
|-----------------|----------------|--|----------------------|---------------------|---------------------|
| VTX00030 | t030 | <i>Acaulospora scrobiculata</i> | Acaulosporaceae | 52 | 3348 |
| VTX00049 | t049 | <i>Scutellospora dipurpurescens</i> , <i>S. aurigloba</i> , <i>S. calospora</i> , | Gigasporaceae | 3 | 69 |
| VTX00052 | t052 | <i>Scutellospora aurigloba</i> , <i>S. calospora</i> | Gigasporaceae | 33 | 763 |
| VTX00055 | t055 | | Claroideoglomeraceae | 2 | 31 |
| VTX00056 | t056 | | Claroideoglomeraceae | 10 | 236 |
| VTX00057 | t057 | | Claroideoglomeraceae | 4 | 100 |
| VTX00062 | t062 | | Diversisporaceae | 3 | 22 |
| VTX00064 | t064 | <i>Glomus Glomus 2</i> , <i>G. africanum</i> , <i>Septoglomus furcatum</i> , <i>S. fuscum</i> , <i>S. xanthium</i> | Glomeraceae | 2 | 60 |
| VTX00072 | t072 | | Glomeraceae | 10 | 611 |
| VTX00074 | t074 | <i>Glomus Glomus 1</i> | Glomeraceae | 3 | 63 |
| VTX00078 | t078 | | Glomeraceae | 6 | 278 |
| VTX00096 | t096 | | Glomeraceae | 10 | 78 |
| VTX00108 | t108 | | Glomeraceae | 50 | 1686 |
| VTX00113 | t113 | <i>Glomus intraradices</i> | Glomeraceae | 73 | 9833 |
| VTX00114 | t114 | <i>Glomus irregulare</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> , <i>G. cf. irregulare</i> | Glomeraceae | 57 | 1331 |
| VTX00115 | t115 | <i>Glomus intraradices</i> , <i>G. irregulare</i> , <i>G. vesiculiferum</i> | Glomeraceae | 35 | 677 |
| VTX00117 | t117 | | Glomeraceae | 1 | 7 |
| VTX00125 | t125 | | Glomeraceae | 28 | 379 |
| VTX00134 | t134 | | Glomeraceae | 16 | 404 |
| VTX00149 | t149 | | Glomeraceae | 4 | 61 |
| VTX00153 | t153 | <i>Glomus Glomus 5</i> | Glomeraceae | 5 | 78 |
| VTX00166 | t166 | <i>Glomus Glomus 5</i> | Glomeraceae | 11 | 78 |
| VTX00193 | t193 | <i>Claroideoglomus lamellosum</i> , <i>C. claroideum</i> , <i>C. luteum</i> , <i>Entrophospora infrequens</i> | Claroideoglomeraceae | 75 | 14389 |

| VTX | Zkratka | Morfotypy | Čeď | Počet vzorků | Součet readů |
|----------|---------|--|----------------------|--------------|--------------|
| VTX00212 | t212 | | Glomeraceae | 23 | 489 |
| VTX00219 | t219 | | Glomeraceae | 28 | 507 |
| VTX00222 | t222 | <i>Glomus indicum</i> | Glomeraceae | 48 | 1132 |
| VTX00225 | t225 | | Claroideoglomeraceae | 38 | 865 |
| VTX00231 | t231 | | Acaulosporaceae | 1 | 15 |
| VTX00233 | t233 | | Glomeraceae | 2 | 83 |
| VTX00245 | t245 | <i>Archaeospora trappei</i> , <i>A. schenckii</i> | Archaeosporaceae | 33 | 736 |
| VTX00256 | t256 | | Glomeraceae | 27 | 911 |
| VTX00276 | t276 | | Claroideoglomeraceae | 41 | 784 |
| VTX00281 | t281 | <i>Paraglomus laccatum</i> | Paraglomeraceae | 68 | 3478 |
| VTX00283 | t283 | <i>Ambispora fennica</i> , <i>A. gerdemannii</i> , <i>A. granatensis</i> | Ambisporaceae | 9 | 222 |
| VTX00308 | t308 | | Paraglomeraceae | 1 | 2 |
| VTX00340 | t340 | | Claroideoglomeraceae | 1 | 6 |
| VTX00344 | t344 | | Glomeraceae | 5 | 39 |
| VTX00347 | t347 | <i>Diversispora trimurales</i> | Diversisporaceae | 1 | 13 |
| VTX00371 | t371 | | Glomeraceae | 3 | 114 |
| VTX00387 | t387 | | Glomeraceae | 41 | 1497 |
| VTX00431 | t431 | | Glomeraceae | 6 | 114 |
| VTX00444 | t444 | | Paraglomeraceae | 4 | 53 |
| VTX00457 | t457 | | Glomeraceae | 1 | 5 |