

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Petra Havlíčková**

Vliv rostlin na strukturu, funkci a diverzitu společenstev bakterií

Effect of plants on the structure, function and diversity of bacterial communities

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Baldrian, PhD.

Praha, 2018

**Charles University**

Faculty of Science

**Prohlášení:**

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

V Praze, 3. 8. 2018

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. RNDr. Petrovi Baldrianovi, PhD. za možnost vypracovat tuto diplomovou práci pod jeho vedením, za trpělivost, podporu a odborné rady. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Laboratoře environmentální mikrobiologie, jmenovitě především Mgr. Dianě Navrátilové za hlavní organizaci práce na obou projektech, Mgr. Petrovi Kohoutovi a Mgr. Vojtěchovi Tláskalovi za pomoc při bioinformatickém a statistickém vyhodnocování výsledků. Projekty byly financovány Grantovou agenturou České republiky č. 18-25706S a MŠMT č. LM2015055 a č. LTT17022.

## Abstrakt

Je známo, že složení vegetace může mít vliv na složení společenstev bakterií. V ekosystému mají bakterie mnoho funkcí, působí jako symbionti kořenů, podílejí se také na rozkladu rostlinné biomasy. Dále mohou být ovlivněny půdní chemií, ale také rostlinnými exsudáty. Některé rostliny produkují cílené exsudáty, které přitahují specifické bakterie na jejich kořeny. Bakterie s rostlinami často asociují, ale vliv rostlin na diverzitu a složení bakteriálních společenstev je stále nedostatečně prozkoumaný. Cílem této práce bylo popsat vztah mezi diverzitou a složením společenstev bakterií a diverzitou vegetace v lučném a lesním ekosystému a identifikovat další faktory, které bakteriální společenstva ovlivňují. Jako studijní oblasti byly vybrány plochy s gradientem diverzity vegetace v NPR Čertoryje a NP Šumava. Předpokládala jsem, že diverzita bakteriálních společenstev se zvyšuje s rostoucí diverzitou rostlin. Složení bakteriálních společenstev bylo charakterizováno sekvenováním 16S rRNA. Složení vegetace bylo určeno pomocí botanických snímků i pomocí molekulárních markerů *trnL*. V lučném ekosystému existoval pozitivní vztah mezi rostlinnou a bakteriální diverzitou pouze v nadzemních částech rostlin. V nadzemních částech rostlin bylo složení bakteriálního společenstva nejvíce ovlivněno faktorem prostoru a vegetace, v kořenech chemismem půdy, v půdě faktorem prostoru a chemismem půdy. V lesním ekosystému byl vztah mezi rostlinnou a bakteriální diverzitou pozitivní ve všech studovaných habitatech - v opadu, v kořenech i v půdě. Vegetace, chemie prostředí i prostorová lokalizace vzorků byly identifikovány jako významné faktory ovlivňující složení bakteriálního společenstva v půdě a v opadu. V kořenech se zdá být nejvýznamnějším faktorem složení vegetace. Tato diplomová práce by měla přispět k porozumění vztahu mezi diverzitou vegetace a diverzitou a složením bakteriálních společenstev v lučném a lesním ekosystému.

Klíčová slova: diverzita, složení společenstva bakterií, luční ekosystém, lesní ekosystém, půda, opad, kořeny, nadzemní části rostlin

## Abstract

Vegetation is known to influence the composition of microbial communities. Bacteria can act as roots symbionts or be involved in the decomposition of plant biomass. They can be influenced by soil chemistry but also by plant exudates. Some plants produce targeted exudates to attract specific bacteria to their roots. Bacteria associate with plants frequently but the effect of plant diversity on bacterial communities on their roots and in the surrounding soil remains unclear. The aim of this work was to describe the relationship between the diversity and community composition of bacteria and the diversity of vegetation in forest and grassland ecosystems. The study areas were selected to represent a gradient of vegetation in Bohemian Forest NP and in White Carpathian flowery grasslands. I hypothesized that the diversity and evenness of bacterial community increase with increasing plant diversity. The composition of bacterial community was characterized by 16S rRNA sequencing. The composition of vegetation was determined by phytocenological relevées and by molecular markers *trnL*. In grassland ecosystem, there was a positive relationship between plant and bacterial diversity only in shoots. The space and vegetation were identified as an important drivers of bacterial community composition in shoots. The soil chemistry was another significant driver of bacterial community composition in roots and soil, the community in soil was further affected also by space. In forest ecosystem, the relationship between plant and bacterial diversity was positive in all habitats - in litter, roots and soil. Vegetation, chemistry and spatial location were identified as important drivers affecting the bacterial community composition in soil and litter. The composition of vegetation seems to be the most important in roots. This thesis should contribute to the understanding of the relationships between diversity of vegetation and diversity and the composition of bacterial communities in grassland and forest ecosystems.

Key words: diversity, bacterial community composition, grassland ecosystem, forest ecosystem, soil, litter, roots, shoots

## Obsah

1. Úvod.....	7
2. Přehled literatury.....	9
2. 1 Vztah mezi rostlinami a mikroorganismy.....	9
2. 2 Bakterie v lesních ekosystémech.....	16
2. 3 Bakterie v travních ekosystémech.....	20
3. Cíle práce.....	23
4. Materiál a metody.....	25
4. 1 Experiment 1 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučním ekosystému.....	25
4. 1. 1 Studované plochy a experimentální design.....	25
4. 1. 2 Molekulární analýzy.....	27
4. 1. 3 Bioinformatická analýza a statistika.....	28
4. 2 Experiment 2 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému.....	30
4. 2. 1 Experimentální plochy a design vzorkování.....	30
4. 2. 2 Molekulární analýzy.....	32
4. 2. 3 Bioinformatická analýza a statistika.....	32
5. Výsledky.....	35
5. 1 Experiment 1 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučním ekosystému.....	35
5. 1. 1 Vlastnosti půdy a vegetace.....	35
5. 1. 2 Diverzita a složení bakteriálního společenstva.....	35
5. 2 Experiment 2 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému.....	40
5. 2. 1 Vlastnosti půdy, opadu a vegetace.....	40
5. 2. 2 Diverzita a složení bakteriálního společenstva .....	41

6. Diskuse.....	52
6. 1 Experiment 1 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučním ekosystému.....	52
6. 2 Experiment 2 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému.....	54
7. Souhrn.....	58
8. Doplnkové tabulky.....	59
9. Seznam použité literatury .....	61



## Seznam zkratek

AICc	Akaike information criterion
dNTP	Dinukleotid trifosfát
GLM	General linear model (obecný lineární model)
NMDS	Non-metric multidimensional scaling
OTU	Operational taxonomic unit (operační taxonomická jednotka)
PCA osy	Osy analýzy hlavních komponent
PCNM	Principal coordinates of neighbour matrices
RDA	Redundanční analýza
<i>trnL</i> marker	část intronu v genu pro tRNA
VIF	Variance inflation factor
VarPart	Variation partitioning analýza



# 1 Úvod

Bakterie hrají v ekosystému důležitou roli nejenom v biogeochemických cyklech (Mooshammer *et al.*, 2014; Van Der Heijden *et al.*, 2008), také řídí půdní procesy jako je rozklad organické hmoty, mineralizace, včetně procesů spojených s uvolňováním skleníkových plynů typu oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>), oxidu dusného (N<sub>2</sub>O) a metanu (CH<sub>4</sub>) do atmosféry (Kolb, 2009; Thomson *et al.*, 2012). Co více, některé půdní bakterie podporují růst a produktivitu rostlin.

Lesní i luční ekosystémy reprezentují vysoce dynamické a komplexní ekosystémy. Bakteriální společenstva žijící v těchto ekosystémech jsou ovlivněna širokou škálou biotických i abiotických faktorů. Jedním z hlavních faktorů jsou chemické vlastnosti daného prostředí (půdy, opadu, kořenů,...) zejména obsah uhlíku, dusíku, obsah organické hmoty v půdě, také obsah dalších živin a pH prostředí (Fierer a Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Rousk *et al.*, 2010). Bylo potvrzeno, že pH prostředí je jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících složení bakteriálního společenstva (Lauber *et al.*, 2008). Složení vegetace a její aktivita jsou potom druhým typem faktorů, které ovlivňují mikrobiální společenstva (Prescott a Grayston, 2013; Tedersoo *et al.*, 2016; Urbanová *et al.*, 2015). Působení těchto parametrů je dále doprovázeno náhodnými účinky na uspořádání mikrobiálních společenstev (Bahram *et al.*, 2016).

Nejenom obsah půdních živin, také fyzikálně - chemické vlastnosti půdy (Gibbons *et al.*, 2017; Šnajdr *et al.*, 2013) jsou v ekosystému moderovány prostřednictvím rostlinných společenstev. Současně se předpokládá, že diverzita rostlinných společenstev podpoří diverzitu mikrobů např. produkcí různých kořenových exsudátů (Millard a Singh, 2010; Wardle, 2006). Rostlinné exsudáty tímto mechanismem modelují mikrobiální společenstva. Celkově rostliny vypouštějí až 20% fixovaného uhlíku a 15% dusíku (el Zahar Haichar *et al.*, 2016; Venturi a Keel, 2016), což zahrnuje řadu jednoduchých molekul, jako jsou cukry, organické kyseliny a sekundární metabolity, stejně jako komplexní polymery. Ačkoli každá rostlina produkuje exsudáty, množství a složení těchto kořenových exsudátů se často liší. Za prvé, vylučování je definováno genotypem hostitele (Mönchgesang *et al.*, 2016). Za druhé, exsudace se mění s vývojovým stupněm rostlin (Chaparro *et al.*, 2013). Za třetí, exsudace je ovlivněna abiotickými stresy (Carvalhais *et al.*, 2013). Tyto odlišnosti exsudace jsou komplexním mechanismem, kterým rostliny mohou modulovat svoje interakce s mikroby.

Specifické podskupiny mikroorganismů jsou schopné shromáždit se do společenstev asociovaných s rostlinami, což ovlivňuje zdraví hostitele a je důležité i pro samotný rostlinný

mikrobiom. Zatímco existuje velké spektrum rostlinných fenotypů vyvolaných mikroby, členové mikrobiálních společenstev mají prospěch z životních podmínek, které jim rostliny poskytují. Nedávné pokroky v technologiích moderní molekulární biologie (metagenomika, metatranskriptomika,...) nám dávají schopnost identifikovat a přiřadit funkce i mikroorganismům, které obývají jak nadzemní, tak podzemní rostlinné tkáně a je obtížné je studovat běžnými přístupy klasické mikrobiologie. Začínáme odhalovat molekulární mechanismy sestavování mikrobiomu a činnosti, které přispívají k celkovému zdraví rostlin nejen na úrovni jednotlivých organismů, ale i na úrovni společenstva (Lebeis, 2015)

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Vztah mezi rostlinami a mikroorganismy

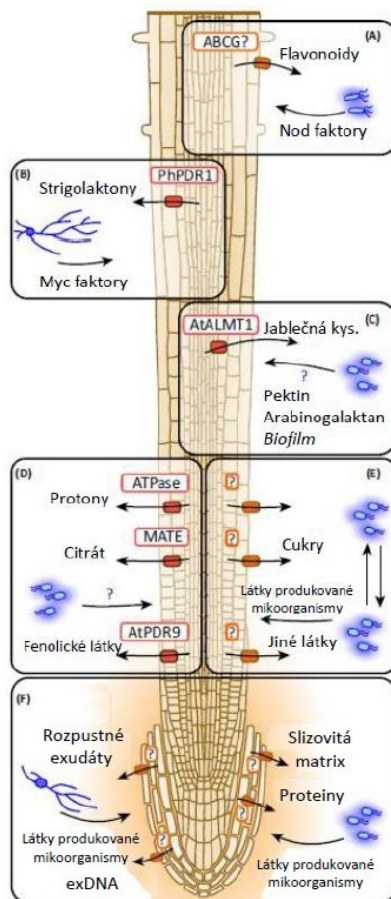
Mikroorganismy mají nezastupitelnou roli ve fungování terestrických ekosystémů. Obývají nejrůznější prostředí, kde spolu s makroorganismy výrazně napomáhají fungování ekosystému (Baldrian, 2017). Obecně je odhadováno, že nejméně 20 000 rostlinných druhů vyžaduje pro svůj růst nebo přežití mutualistický vztah s půdními organismy (Van Der Heijden *et al.*, 2008), v kontrastu s tím existují ale také patogenní mikroorganismy, které hrají roli v koexistenci určitých rostlinných druhů (Bagchi *et al.*, 2014).

Přítomnost mikroorganismů v ekosystému není omezena pouze na půdní prostředí. Nejrůznější mikroorganismy (symbiotické, patogenní, mutualistické) osídlují různé habitaty, včetně např. kořenů rostlin a nadzemních rostlinných tkání (Baldrian, 2017).

Vzhledem k úloze cévnatých rostlin jako dominantních primárních producentů v ekosystému je velmi důležitý rostlinný mikrobiom (Lebeis, 2015). Za habitaty související s rostlinami lze považovat nadzemní (tělo rostliny) a podzemní části (kořeny), které jsou velmi odlišné vzhledem k jejich struktuře a funkci a liší se také složením asociovaných mikrobiálních společenstev (Baldrian, 2017; Lebeis, 2015).

Rostlinné tkáně jsou cílem útoku patogenních mikroorganismů a není tedy překvapením, že rostliny používají mechanismy, které jim pomáhají selektovat ty mikroorganismy, se kterými budou asociovat a naopak vyloučit ty potenciálně nebezpečné. Kolonizace kořene často probíhá i přes sofistikovaný rostlinný imunitní systém a předpokládá se, že dochází k selekci mutualistů a komenzálů a k potlačení patogenů. Genetické principy, kterými se řídí determinace endofytických (kořenových) společenstev od společenstev v půdě jsou velmi málo prozkoumané (Lundberg *et al.*, 2012; Van Der Heijden *et al.*, 2008). Kořeny rostlin potlačují přítomnost a růst některých druhů mikroorganismů, a naopak jiné druhy podporují, včetně bakterií, které jim prospívají (Dean *et al.*, 2015). Jedním ze známých projevů této rostlinné specifity je produkce kořenových exsudátů (Broeckling *et al.*, 2008; Eisenhauer *et al.*, 2017). Tyto organické látky produkované rostlinnými kořeny jsou známé jako významná hnací síla, která ovlivňuje půdní mikrobiální společenstva. Větší kořenová biomasa zapříčiněná vyšší rostlinnou diverzitou zvyšuje dostupnost organických substrátů pro půdní biotu. Významné je jak množství, tak diverzita kořenových exsudátů, a bylo prokázáno, že se zvyšující se rostlinnou diverzitou stoupá nejenom množství těchto exsudátů, ale také např. bakteriální biomasa (Eisenhauer *et al.*, 2017).

Existují i další studie, které se zabývají kořenovou fyziologií a rolí exsudátů. Tyto studie potvrzují, že je zatím známo pouze několik málo rostlinných transportních proteinů účastnících se transportu kořenových metabolitů (Obr. 1). Flavonoidy (Obr. 1A) jsou vylučované pravděpodobně transportéry typu ABCG (Banasiak *et al.*, 2018). Reagují na ně rhizobia, která produkují Nod faktory, mohou tak prostupovat přes kořenové vlásky nebo trhlinami mezi buňkami epidermis (Madsen *et al.*, 2010). Strigolaktony (Obr. 1B) jsou vylučovány transportéry typu PhPDR1, které jsou lokalizované v subepidermální vrstvě rostoucího kořene (Kretschmar *et al.*, 2012) a jsou vnímány houbami z oddělení *Glomeromycota*, které naopak produkují Myc faktory. Transportér AtALMT1 (Obr. 1C), který je lokalizován v kortexu rostoucí zóny kořene, se podílí na exsudaci kyseliny jablečné u rostlin druhu *Arabidopsis thaliana* infikovaných rodem *Pseudomonas*, což přitahuje *Bacillus subtilis* (Rudrappa *et al.*, 2008). *B. subtilis* vytváří na kořenech rostlin biofilm. Tento proces je závislý na kořenovém pektinu a arabinogalaktanu (Beauregard *et al.*, 2013). ATPázy vylučují protony měnící pH rhizosféry (Obr. 1D), což umožňuje transportní procesy závislé na protonech. MATE transportéry vylučují citrát (Sharma *et al.*, 2016), který může být metabolizován mikroorganismy a AtPDR9 transportér přenáší fenolické látky (Baetz a Martinoia, 2014). Signální funkce a potenciální „crosstalk“ s mikroorganismy jsou v současné době neznámé. Účast těchto transportérů v exsudaci (Obr. 1E) je zatím velmi málo prozkoumána (Besnard *et al.*, 2018; Jones *et al.*, 2009; Moe, 2013). Mikrobiální společenstvo zralé kořenové vrstvy bývá odlišné od kořenových špiček (Massalha *et al.*, 2017). Členové mikrobiálního společenstva zralé kořenové vrstvy patří zčásti také mezi saprotrofy živící se odumřelými buňkami na starších částech kořene (Jones *et al.*, 2009). Kořenové špičky jsou prvotní tkání, která přichází do kontaktu s volnou půdou a přilehlé buňky kořene zde produkují slizovitou matrix bohatou na proteiny, extracelulární DNA a další metabolity (Obr. 1F). Společně všechny tyto látky ovlivňují mikrobiální společenstvo. Studie zabývající se kořenovou fyziologií a rolí exsudátů dále také navrhují skupiny látek, které se tohoto procesu mohou účastnit – cukry, deriváty cukrů s fosfátem nebo alkoholem, aminokyseliny, organické kyseliny, nukleotidy, peptidy, anorganické látky (nitráty, fosfáty, sulfáty) a sekundární metabolity (Sasse *et al.*, 2018).



Obr. 1: Síť rostlinných a mikrobiálních exometabolitů a transportních proteinů v rhizosféře. (převzato z Sasse *et al.*, 2018).

Kolonizace rhizosféry probíhá ve dvou krocích, první krok – kolonizace podskupinou mikroorganismů z půdního společenstva, druhý krok – povrch kořene a endosféra jsou kolonizovány podskupinou populace rhizosféry (Bulgarelli *et al.*, 2013; Edwards *et al.*, 2015). Zajímavostí je, že byla objevena skupina opakujících se rhizosférických mikroorganismů (rhizomikrobiom) nazvaná jako „core root microbiome“ (Bulgarelli *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2016). Na jedné straně některé rostlinné faktory vedou k vytvoření „core root microbiomu“, na druhé straně jiné, specifické rostlinné faktory, podmiňují výskyt dalších mikroorganismů, kteří nejsou členy „core root microbiomu“. V experimentech s rozdílnými genotypy ječmene a huseníčku bylo prokázáno, že tyto rostliny si udržují na svých kořenech specifické taxonomické skupiny mikroorganismů s různým zastoupením, přestože obě rostliny byly pěstovány ve stejných podmínkách (Bulgarelli *et al.*, 2015). Oproti tomu ne všechny druhy rostlin mají rozdílný rhizomikrobiom v porovnání s volnou půdou: některé druhy, jako je například rýže mají rhizomikrobiomy podobné půdním společenstvům (Bulgarelli *et al.*, 2015; Edwards *et al.*, 2015; Schlaeppi *et al.*, 2014).

Síla efektu rhizosféry se mění s vývojovou fází rostliny (Chaparro *et al.*, 2013; Schreiter

*et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015). Stejně tak bylo zjištěno, že se s věkem rostliny mění mikrobiální společenstvo na kořeni i produkce kořenových exsudátů (Chaparro *et al.*, 2013). Některé pionýrské studie ukázaly schopnost mikrobů měnit vývoj rostlin. Celkově se zdá být jisté, že genotyp, domestikace a vývoj rostlin ovlivňují složení rhizomikrobiomů (Panke-Buisse *et al.*, 2017).

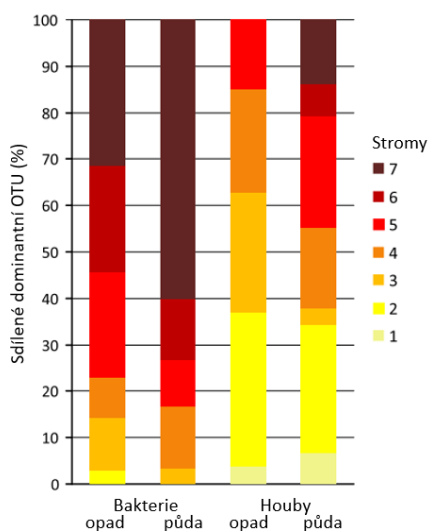
Na rozdíl od volné půdy funguje rhizosféra jako prostředí bohaté na snadno rozložitelné uhlíkaté látky a není překvapením, že je takovéto prostředí pro řadu mikroorganismů atraktivní. Různá schopnost mikrobů metabolizovat exsudáty rostlin pak podmiňuje jejich schopnost toto prostředí osídlit. Několik studií zkoumalo, zda diverzita exsudátů rostlin koreluje s mikrobiální diverzitou. Některé z těchto studií zjistily, že vyšší rostlinná diverzita koreluje s vyšší mikrobiální diverzitou (Eisenhauer *et al.*, 2013; Prober *et al.*, 2014) a při přidání směsi různých exsudátů k rostlinné monokultuře dojde ke zvýšení mikrobiální diverzity (Steinauer *et al.*, 2016). Zajímavé je, že bakteriální izoláty z půd, kde je diverzita rostlin vysoká, mají široké niky a vykazují menší soutěžení o zdroje než izoláty z prostředí s nízkou rostlinnou diverzitou (Essarioui *et al.*, 2016, 2017). Ačkoli se zdá, že v globálním měřítku mají na mikrobiální diverzitu největší vliv faktory půdního prostředí (Prober *et al.*, 2014), můžeme konstatovat, že v měřítku lokálním by vysoká diverzita rostlin měla podporovat vysokou diverzitu mikrobiálního společenstva.

Přestože složení mikrobiálního společenstva v nadzemních částech rostlin je spíše nahodilé a vykazuje v průběhu času značné rozdíly, mimo jiné také vlivem sezónnosti či klimatických podmínek (Lebeis, 2015; Peñuelas *et al.*, 2012), byla pozorována určitá specifita vztahu rostlina – mikroorganismu. Jako nejsilnější faktor ovlivňující složení bakteriálního společenstva fylosféry byl identifikován druh hostitelské rostliny (Laforest-Lapointe *et al.*, 2016).

Kromě selekce specifických symbiotických mikroorganismů ve svých kořenech a nadzemních částech, bylo prokázáno, že rostliny mají vliv i na mikrobiální společenstva v půdě (Barberán *et al.*, 2015; Gibbons *et al.*, 2017; Urbanová *et al.*, 2015). Výsledky práce Barberán (2015), která se zabývala vztahy mezi rostlinnými společenstvy a mikrobiálními společenstvy půdy v tropických lesích, naznačují, že složení mikrobiálního půdního společenstva je určeno taxonomickým a fylogenetickým složením rostlinných společenstev. Na rozdíl od očekávání, druhové zastoupení kořenů v půdních vzorcích bylo pouze slabým faktorem určujícím složení mikrobiálního půdního společenstva. V práci Urbanová (2015) byly analyzovány faktory ovlivňující složení bakteriálního společenstva v lesní půdě a opadu pod sedmi různými druhy stromů. Byla potvrzena odlišnost mezi oběma společenstvy. Vliv druhu



stromu na složení bakteriálního společenstva byl ověřen jako významný jak v opadu, tak v půdě, i když tento vliv byl pravděpodobně částečně zprostředkován chemickým složením a pH opadu a půdy. Faktor vlivu druhu stromu vysvětloval asi 15% variability v datech pro složení bakteriálního společenstva v opadu a 7% variability v datech pro složení bakteriálního společenstva v půdě. Podobnost bakteriálních společenstev byla obecně vyšší než u houbových společenstev. V případě houbových společenstev bylo zjištěno, že 37% dominantních OTU v opadu a 35% dominantních OTU v půdě bylo nalezeno pouze pod jedním nebo dvěma druhy stromů. V případě bakterií bylo nalezeno pouze 3% dominantních OTU v půdě pod jedním nebo dvěma druhy stromů. Na druhé straně bylo nalezeno 77% dominantních bakteriálních OTU v opadu a 83% v půdě pod šesti nebo sedmi stromy (Obr. 2). Z práce Gibbons (2017) vyplynulo, že při šíření invazních rostlin dochází nejen ke změně rostlinného společenstva, ale také k posunu edafických vlastností půdy a k posunu v množství specifických mikrobiálních taxonů. I když celkové podzemní složení společenstva a jeho funkční potenciál byly poměrně konstantní, bylo ukázáno, že každá invazní rostlina měla unikátní vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti půdy.



Obr. 2: Specifita výskytu mikrobiálních taxonů s jediným dominantním stromem nebo několika druhy stromů. (převzato z Urbanová *et al.*, 2015).

Všechna tato zjištění nejsou překvapující, pokud vezmeme v úvahu, že mikroorganismy fungují jako specifictí kořenoví symbionti rostlin, kteří – zejména v případě hub – zasahují i do půdy (Peay *et al.*, 2013). Dominantní rostliny jejich prostřednictvím významně ovlivňují obsah půdních živin i fyzikálně-chemické vlastnosti půdy (Gibbons *et al.*, 2017; Šnajdr *et al.*, 2013). Navíc bylo zjištěno, že rostlinná aktivita ovlivňuje prostředí rhizosféry pomocí specifického složení kořenových exsudátů. Toto bylo potvrzeno v mikrokosmovém experimentu, kde byly

cíleně aplikované různé směsi modelových exsudátů: vysoce x nízko rozmanitá směs exsudátů a směs bohatá na uhlík x bohatá na dusík. Molekulární fingerprinting (T-RFLP analýza) odhalil významné odlišnosti v mikrobiálních společenstvech a bylo potvrzeno, že diverzita kořenových exsudátů je pro rostliny velmi silný nástroj, pomocí něhož ovlivňují mikrobiální půdní společenstva (Steinauer *et al.*, 2016).

Selekce specifických mikroorganismů v různých částech rostlin a v půdě by teoreticky měla vést k pozitivní vazbě mezi rostlinnou a mikrobiální alfa diverzitou, tzn. druhovou diverzitou (počtem taxonů) v rámci jednoho stanoviště (Prober *et al.*, 2014; Urbanová *et al.*, 2015; Wardle, 2006). V tomto tématu můžeme najít nejednoznačnost mezi výsledky jednotlivých studií, zvláště s ohledem na půdní mikrobiom. Zatímco některé studie nezjistily vztah mezi rostlinnou a půdní mikrobiální alfa diverzitou (McElroy *et al.*, 2012; Prober *et al.*, 2014), existuje několik dalších, kde byly tyto vztahy demonstrovány jak v experimentálních podmínkách (Milcu *et al.*, 2013), tak i v reálných ekosystémech (Hiiesalu *et al.*, 2014; Meadow a Zabinski, 2012). V práci McElroy (2012) bylo naznačeno, že zatímco přítomnost určitého rostlinného druhu ovlivňuje rostlinnou produkci, abundance a funkční diverzita půdních organismů obecně tímto faktorem není ovlivněna. Bylo ale prokázáno, že složení společenstva rostlin ovlivňuje složení půdního společenstva. Podobně v práci Prober (2014) bylo zjištěno, že rostlinná alfa diverzita (druhová diverzita v rámci jednoho stanoviště) pouze slabě korelovala s diverzitou půdního mikrobiálního společenstva. Oproti tomu rostlinná beta diverzita (druhová diverzita mezi různými stanovišti) významně korelovala s beta diverzitou mikrobiálního půdního společenstva. Nedávné studie hodnotící úlohu biologické diverzity pro fungování ekosystémů naznačují, že diverzita funkčních znaků a evoluční historie druhů ve společenstvu, nikoli počet taxonomických jednotek, nakonec řídí vztah mezi biodiverzitou a ekosystémem. V práci Milcu (2013) byla současně posuzována důležitost funkčního znaku rostliny a fylogenetické diverzity jako prediktorů hlavních skupin půdní bioty (její abundance a diverzitu), šest let od počátku experimentu s biologickou diverzitou trávnicků. Funkční diverzita byla spolehlivým prediktorem pro většinu bioty, s výjimkou půdních mikroorganismů, které byly lépe předpovězeny fylogenetickou diverzitou. Tyto výsledky poskytují empirickou podporu myšlence, že diverzita funkčních znaků rostlin a diverzita evolučních linií ve společenstvu jsou důležité pro udržení vyšší abundance a diverzity půdních společenstev. Je třeba podotknout, že práce Hiiesalu *et al.*, 2014; Meadow a Zabinski, 2012 se zabývají převážně společenstvy hub a o bakteriálních společenstvech informace chybí.

Pro kořenové mikroorganismy také existují studie, které demonstrují vazby mezi rostlinnou diverzitou a diverzitou mikroorganismů. Zdá se, že tyto vazby jsou těsnější ve vztahu rostlina – houba, než rostlina – bakterie (Meadow a Zabinski, 2012; Millard a Singh, 2010).

U rostlinných endofytů chybí studie spojující hostitelskou rostlinu a mikrobiální alfa diverzitu, avšak je známo, že mikrobiomy různých rostlin mají odlišné složení (Carrell a Frank, 2015).

Co se týká zajímavých funkčních adaptací, bylo potvrzeno, že společenstva endofytických bakterií jsou pro rostliny důležitá při získávání živin, odolávání vůči stresu a byly nalezeny vztahy např. mezi jehličnatými stromy a bakteriemi octového kvašení, které se vyskytují ve vysokých hustotách uvnitř borovicových jehlic. Podobně jako u borovic byly v jehličnatých endofytických společenstvech nalezeny tyto bakteriální kmeny *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* a *Actinobacteria*. Nicméně, i když se některé OTU vyskytovaly s vysokým relativním výskytem 10-40% v několika vzorcích, žádná skupina bakterií neměla celkově dominantní charakter v jehličnatých endofytických společenstvech. Byly nalezeny dominantní bakteriální skupiny, (např. *Bacillus*, *Burkholderia*, *Actinomycetes*), které jsou významné pro potlačení škůdců a chorob, což zvyšuje možnost, že endofytický mikrobiom chrání stromy před biotickým stresem (Carrell a Frank, 2015).

V současné době se zdá, že otázka vztahu mezi diverzitou rostlin a mikroorganismů stále není uspokojivě zodpovězena (Fierer a Jackson, 2006). Tento nedostatek konzistentních výsledků je pravděpodobně alespoň částečně způsoben experimentálními omezeními dosud provedených studií. Zatímco podmínky prostředí jsou snadno ovladatelné v manipulačních experimentech, je zde obtížné dosáhnout ekvivalentního počtu rostlinných druhů a jejich relativních abundancí tak jako v přirozených podmínkách ekosystému (Eisenhauer *et al.*, 2017; Milcu *et al.*, 2013; Schlatter *et al.*, 2015). Naproti tomu analýza přirozeného ekosystému může představovat problém, pokud jde o prostorové uspořádání, kde samotný prostor, půdní vlastnosti nebo klima jsou dalšími faktory ovlivňující diverzitu rostlin i mikroorganismů (de Vries *et al.*, 2012; Wardle, 2006). A konečně některé výsledky také závisí na návrhu vzorkování; například diverzita rostlin může být odhadnuta na velkých plochách, zatímco pro stanovení mikrobiální diverzity se používají pouze malé vzorky (Prober *et al.*, 2014; Regan *et al.*, 2014) a výsledky jsou pro lesních ekosystémy také obtížně interpretovatelné, protože vegetace v nich tvoří několik pater, která mohou mít rozdílný vliv (Peay *et al.*, 2013; Prescott a Grayston, 2013; Urbanová *et al.*, 2015). Zdá se, že je zapotřebí rozumného experimentálního návrhu, který umožňuje správnou analýzu modelu, tento úkol je ale v praxi obtížně dosažitelný.

## 2. 2 Bakterie v lesních ekosystémech

S odhadovanou velikostí okolo 38 milionů čtverečných kilometrů a celkovým počtem stromů přesahujícím tři biliony patří lesy k nejrozsáhlejším ekosystémům (Crowther *et al.*, 2015; Peh *et al.*, 2015; Perry *et al.*, 2008). Jednou z nejdůležitějších funkcí je jejich schopnost akumulovat uhlík. Příjem uhlíku fotosyntézou převyšuje ztráty vzniklé při rozkladu organické hmoty o 7-25 %, přebytečný uhlík je akumulován v lesních půdách (Malhi *et al.*, 1999). Další důležitou funkcí lesního ekosystému je ovlivňování biogeochemických cyklů, především dusíku, síry a fosforu, a také ovlivňování klimatu (Perry *et al.*, 2008). Organická hmota je v půdě ukládána jako komplexní produkt, pocházející zejména z rozkladu opadu a mrtvého dřeva, nebo také jako rhizodeposity – exsudáty, jednoduché uhlíkaté látky dodávané do půdy rostlinnými kořeny (Sasse *et al.*, 2018). Na přeměně a využití kořenových exsudátů, stejně jako organické hmoty, se velkou měrou podílejí mikroorganismy.

Les je ekosystém, jehož nejvýznamnější živou složkou jsou stromy, které fixují uhlík a jsou tedy dominantními primárními producenty v tomto ekosystému. Fungování lesa je velmi závislé na fungování stromů a podíl stromového patra na primární produkci obvykle přesahuje 90%. V lesním ekosystému existují také další patra rostlinné vegetace, jako je např. vegetace podrostu. Její kvantitativní podíl na tvorbě organické hmoty většinou nepřevyšuje 10% (Peh *et al.*, 2015; Perry *et al.*, 2008). Přibližně 33-50% uhlíku, který stromy fixují, je alokováno do půdy ve formě sacharidů, aminokyselin a organických kyselin hlavně pomocí jejich kořenů (Högberg *et al.*, 2001). Tyto uhlíkaté látky jsou poté předávány mikroorganismům v rhizosféře i volné půdě, a to buď přímo, nebo prostřednictvím hub, žijících v symbióze s rostlinnými kořeny.

Obecně vegetace v lesích, hlavně stromy, regulují nadzemní a podzemní interakce v ekosystému (Wardle *et al.*, 2004). Lesní mikrobiom je významně ovlivňován druhovou identitou stromů. Některé bakterie žijící v rhizosféře nebo na povrchu kořenů často preferují určitý hostitelský strom. Stejně tak ektomykorhizní symbióza hub s kořeny rostlin je vázána na specifický druh stromu. Zde je vztah rostlina mikroorganismus ještě užší. Rovněž fylosféra, opad či půda v blízkosti konkrétního druhu stromu si drží specifické složení společenstva mikroorganismů (Prescott a Grayston, 2013; Redford *et al.*, 2010; Tedersoo *et al.*, 2016; Urbanová *et al.*, 2015). Druhová identita stromu má také průkazný vliv na aktivitu veškeré mikrobiální biomasy v půdě a opadu (Augusto *et al.*, 2015; Šnajdr *et al.*, 2013).

Mikroorganismy žijící v opadu, půdě i v samotných stromech jsou ovlivněny druhovou identitou stromů v lesním porostu. I když se vliv stromů na složení bakteriálního společenstva

v půdě zdá být spíš slabší, nepřímý a odrazem odlišného chemismu půdy v daném porostu, tak i přesto je tento vliv významný zejména v oblasti rhizosféry, kde dochází k přímým interakcím mikroorganismů a kořenů rostlin, které produkují specifické kořenové exsudáty (Augusto *et al.*, 2015; Urbanová *et al.*, 2015). Ve volné půdě jsou společenstva mikroorganismů ovlivněny jak diverzitou, tak i druhovou identitou stromu. V závislosti na podmínkách, ale alespoň částečně je tento vliv zprostředkován tím, že stromy ovlivňují půdní chemii (Tedersoo *et al.*, 2016). Navíc stromy jsou také hostitelé pro druhově specifické bakteriální endofyty a některé saprotrofické organismy, které jsou často asociovány s určitými typy rostlinného opadu (Prescott a Grayston, 2013; Urbanová *et al.*, 2015).

Stromy jsou značně závislé na mikrobiálních symbiontech, kteří jim zprostředkovávají přístup k dusíku buď jeho „získáváním“ z odumřelé organické hmoty nebo fixací – přeměnou dusíku z atmosféry na formu pro rostliny dostupnou. Uvádí se, že 80% dusíku a 75% fosforu, které stromy přijmou, je zprostředkováno bakteriemi fixujícími dusík a mykorhizními houbami (Van Der Heijden *et al.*, 2008).

Díky mnohvrstevnosti lesních porostů je tento ekosystém charakterizován vysokou prostorovou heterogenitou jak ve své nadzemní, tak i v podzemní části ekosystému. Tato heterogenita je způsobena přítomností nadzemní vegetace, odumřelého dřeva i kořenů různých rozměrů. Na rozdíl od toho, mají např. luční a travnaté ekosystémy prostorovou heterogenitu často redukovanou prostřednictvím zemědělského obhospodařování (Saetre, 1999; Štursová a Baldrian, 2011). Vysoká prostorová heterogenita lesních ekosystémů se odráží také v půdní chemii a v množství mikrobiální biomasy. Tato heterogenita je významná i u stejnověkých lesních monokultur s výrazně redukovanou nadzemní vegetací (Baldrian *et al.*, 2010a; Gömöryová, 2004; Saetre a Bååth, 2000; Šnajdr *et al.*, 2008). Ještě významnější je však v přirozených lesích s mnohvrstevnou, různověkou vegetací a vysokým výskytem mrtvého dřeva (Obr. 3). V půdě je tato heterogenita a variabilita obrazem historických disturbancí jako jsou vývraty stromů, kůrovcová kalamita, či rozklad mrtvého dřeva (Šamonil *et al.*, 2011; Valtera *et al.*, 2015). Výsledkem je heterogenita mikrohabitatů s odlišnými mikroklimatickými podmínkami a nerovnoměrným rozložením živin (Schaeztl *et al.*, 1988; Šamonil *et al.*, 2010). Také růst kořenů různých velikostí, jejich aktivita a odumírání přispívá k heterogenitě půdy.



Obr. 3: Lesní ekosystém a jeho diverzita. Národní přírodní rezervace Žofínský prales, bez zásahu od roku 1838. Obrázky byly získány v oblasti viditelné na fotografii uprostřed (převzato z Baldrian, 2010).

Prostorová heterogenita ve svrchních vrstvách lesní půdy určuje složení mikrobiálních společenstev pomocí dvou typů odlišných faktorů. Prvním typem faktorů jsou chemické vlastnosti půdy a opadu včetně těch nejdůležitějších, jako jsou obsah organické hmoty, hodnota pH, obsah dusíku a dalších živin. V různé míře tyto faktory ovlivňují bakterie i houby v ekosystému a bylo potvrzeno, že jedním z nejvýznamnějších faktorů je pH (Fierer a Jackson, 2006; Lauber *et al.*, 2008; Rousk *et al.*, 2010). Složení a aktivita vegetace jsou potom druhým typem faktorů, které ovlivňují mikrobiální společenstva. Zdá se, že tyto faktory mohou být více významné pro společenstva hub, nežli bakterií (Prescott a Grayston, 2013; Tedersoo *et al.*, 2016; Urbanová *et al.*, 2015). Relativní působení těchto parametrů je doprovázeno náhodnými účinky na uspořádání mikrobiálních společenstev (Bahram *et al.*, 2016) a společně všechny tyto faktory výrazně ovlivňují variabilitu mikrobiomu v lesních ekosystémech (Štursová *et al.*, 2016).

Prostorová heterogenita lesních půd vede k vysoké prostorové variabilitě v mikrobiální aktivitě (například v enzymové aktivitě nebo respiraci) a k variabilitě v obsahu mikrobiální biomasy. Byly prokázány snižující se vertikální gradienty ve výskytu a aktivitě mikrobů (Šnajdr *et al.*, 2008). Aktivita extracelulárních enzymů a množství mikrobiální biomasy se také liší horizontálně v rozmezí centimetrů až metrů a je často zvýšena v „hotspotech“ aktivity (Baldrian *et al.*, 2010a). V těchto „hotspotech“, jako je např. rhizosféra, může být podíl aktivních mikroorganismů 2× až 20× vyšší než ve volné půdě a jejich specifická aktivita (respirace, mikrobiální růst, enzymatické aktivity, poměr RNA / DNA) může být také mnohem vyšší (Baldrian *et al.*, 2010a; Kuzyakov a Blagodatskaya, 2015). Prostorová heterogenita lesních ekosystémů má výrazný vliv na jejich fungování a značně komplikuje interpretaci dat získaných

experimentálně. Za velkou část celkového fungování ekosystému mohou být zodpovědné „hotspoty“, ale rozsah jejich příspěvku zůstává zatím neznámý.

Lesní ekosystém poskytuje bakteriím rozsáhlé spektrum habitatů, včetně půdy, rostlinných tkání, mrtvého dřeva, hornin atd. Mezi prostředí velmi bohaté na bakterie patří především opad, rhizosféra, půda a její povrch (Hardoim *et al.*, 2015). Půdní bakteriální společenstva vykazují částečnou specificitu pro jednotlivé půdní horizonty. Kmeny Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria a Bacteroidetes jsou nejvíce zastoupeny v organickém a minerálním horizontu v listnatých lesích (López-Mondéjar *et al.*, 2015). Bakteriální společenstva v půdách jehličnatých lesů se také liší mezi horizonty. Ačkoli Acidobacteria, Proteobacteria a Actinobacteria jsou nejhojnější v organickém i minerálním horizontu, organický horizont bývá bohatší na Proteobacteria a Bacteroidetes (Baldrian *et al.*, 2012). Naproti tomu společenstva v minerální půdě obsahují větší podíl bakterií z kmene Firmicutes a Chlorofexi, které jsou více adaptovány na využití rekalcitrantního uhlíku a anorganických zdrojů živin (Lladó *et al.*, 2017).

Vedle rozmanitého společenstva hub, nedávné studie ukázaly také důležitou roli bakterií při rozkladu opadu. V jehličnatém opadu bakterie inkorporovaly dokonce více uhlíku pocházejícího z celulózy než houby. V těchto procesech jsou významné především kmeny Proteobacteria (*Burkholderiales*, *Caulobacteriales*, *Rhizobiales*, a *Xanthomonadales*), Bacteroidetes a Acidobacteria (Štursová *et al.*, 2012). Listnatý opad je charakteristický vysokým výskytem bakterií z kmene Proteobacteria a Bacteroidetes. Mnoho ze zástupců těchto kmenů je považováno za kopiotrofní bakterie, charakteristické především pro čerstvý opad, které preferují snadněji dostupný uhlík (Fierer *et al.*, 2007). Čerstvý opad je také typický vysokým množstvím houbové biomasy, s tím koreluje i výskyt mykofágních bakterií s potenciální mykolytickou aktivitou. Tyto bakterie mohou tvořit až 40% celkového společenstva (Tláskal *et al.*, 2016) a představují odlišnou podmnožinu bakteriálního společenstva včetně členů rodů *Pedobacter* a *Chitinophaga* (kmen Bacteroidetes) a *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Ewingella* a *Stenotrophomonas* (kmen Proteobacteria) (Brabcová *et al.*, 2016).

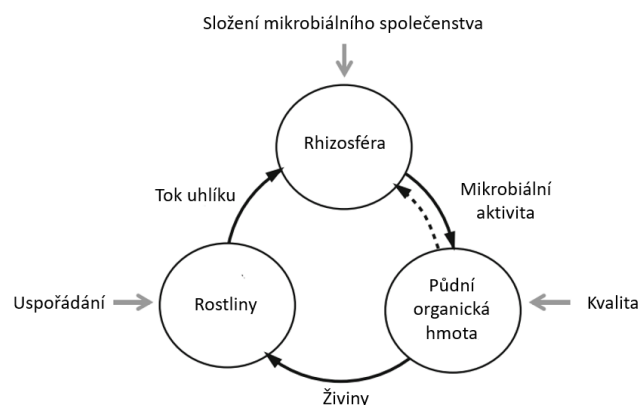
Bakteriální společenstva obývající prostředí kořene a rhizosféry v lesních ekosystémech jsou méně prozkoumaná, než-li společenstva v zemědělsky obhospodařovaných oblastech. Rhizosférní lesní mikrobiom je obohacen kmeny Proteobacteria, Actinobacteria a Bacteroidetes, které jsou podskupinou půdního mikrobiomu. Dále také např. bakteriemi z kmene Proteobacteria (*Burkholderia*, *Rhizobium*, a *Pseudomonas*) a Actinobacteria (*Streptomyces*), které jsou známé asociací s ektomykorhizními houbami (Lladó *et al.*, 2017).

## 2. 3 Bakterie v travních ekosystémech

Luční rostliny ovlivňují mikrobiální aktivitu v okolí svých kořenů uvolňováním uhlikatých látek a studie travnatých ekosystémů mírných i horských luk ukazují vliv různých druhů trav na složení mikrobiálního společenstva půdy (Millard a Singh, 2010). I přes toto zjištění se zdá, že závěry o tom, zda rostlinná diverzita řídí diverzitu mikrobiálního půdního společenstva v lučních ekosystémech jsou poměrně nejednoznačné, také výsledky z terénních studií se zdají být velmi komplexní (Millard a Singh, 2010).

Výsledky práce Shi (2015) poskytují obraz postupné sukcese bakteriálních půdních společenstev jako odpověď na růst kořenů luční trávy *Avena fatua*. Schéma sukcese se zdá být konzistentní během dvou vegetačních období a bylo potvrzeno, že postupná sukcese vede ke snižování diverzity rhizosférického společenstva. Tráva vyvíjí selekční tlak již od počátečních fází růstu, to vede k výrazným změnám společenstva rhizosféry oproti volné půdě. Kořeny trávy selektivně stimulují kmene Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria) a Bacteroidetes a redukuje bakterie z kmene Acidobacteria, Actinobacteria a Firmicutes. Tento rhizosférický mikrobiom poskytuje rostlině výhody týkající se především příjmu živin. Pro rostlinu se tento proces jeví jako velmi důležitý, protože opakovaně přijímá půdní mikroby s podobnými vlastnostmi do svého kořenového prostředí (Shi *et al.*, 2015).

Přesuny uhlíku od rostlin do půdy prostřednictvím kořenových exsudátů a rostlinného opadu stimulují mikrobiální aktivitu a dochází k zvýšení obratu půdní organické hmoty. Tento proces vede k uvolnění živin, které jsou naopak využity rostlinami nebo mikroorganismy samotnými (Obr. 4).



Obr. 4. Zjednodušený model interakcí mezi rostlinami a půdou zprostředkovaný rhizosférickými mikroorganismy (převzato z Millard a Singh, 2010).



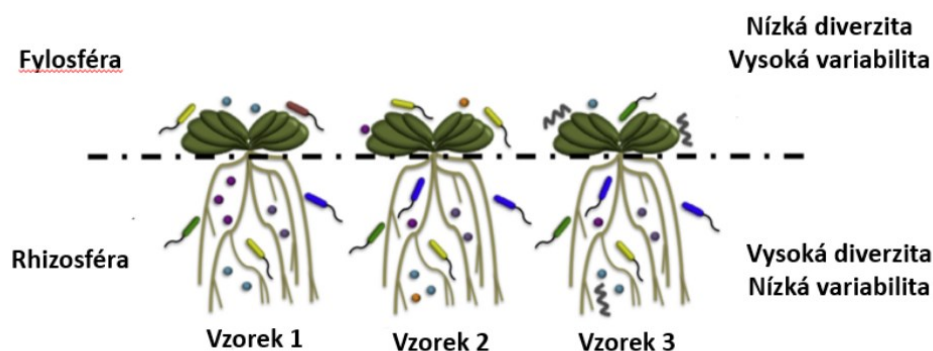
Tyto interakce mohou být ovlivňovány širokou škálou faktorů. Hnojení, vápnění nebo např. pastva ovlivňují na úrovni ekosystému jak růst vegetace, tak vstupy uhlíku do půdy, stejně tak fyzikální i chemické vlastnosti půdy (Millard a Singh, 2010). V půdách kyselých a chudých na živiny, jako jsou horské louky, vede nízké pH k pomalé nitrifikaci a mineralizaci (Williams *et al.*, 1999). V těchto půdách je dostupnost živin pro rostliny silně závislá na mikrobiální aktivitě. Kvalita půdní organické hmoty (determinovaná vstupy uhlíku prostřednictvím vegetace) také ovlivňuje koloběh živin a pravděpodobně i mikrobiální diverzitu (Millard a Singh, 2010). Mikrobiální diverzita je významně vyšší v přirozených neovlivněných lučních ekosystémech, což bylo potvrzeno při srovnávání složení mikrobiálních společenstev pod různými společenstvy rostlin (Bardgett *et al.*, 1996; Grayston *et al.*, 2001, 2004). V publikaci Millard (2010) bylo shrnuto, že houby dominují především v neovlivněných lučních ekosystémech a bakterie dominují v těch, které jsou vápněny a hnojeny. Mezi dominantní bakteriální kmeny (třídy) v lučních půdách patří Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteria, Deltaproteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Betaproteobacteria a Gammaproteobacteria (Kaiser *et al.*, 2016).

Důkazy o interakcích mezi jednotlivými druhy rostlin s půdními mikroorganismy byly zkoumány také na úrovni rhizosféry. Bylo potvrzeno těsné spojení mezi jednotlivými druhy travin a diverzitou jejich mikrobiálních rhizosférických společenstev (Bardgett *et al.*, 1999; Grayston *et al.*, 1998; Innes *et al.*, 2004; Marilley *et al.*, 1998). Toto vedlo k návrhu konceptu koevolučních vztahů v rhizosféře, kde rostlinné kořenové exsudáty modelují půdní mikrobiální společenstvo (Badri a Vivanco, 2009; Paterson *et al.*, 2007). V jiných studiích, které se zabývaly strukturou mikrobiálního lučního společenstva, se však ukázalo, že typ půdy je možná důležitějším faktorem nežli rostlinný druh (Singh *et al.*, 2007). Ke kontrastním výsledkům také přispívá prostorová heterogenita půdy, která byla potvrzena jako další důležitý faktor ovlivňující mikrobiální půdní společenstvo (Ritz *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009). Na rozdíl například od extrémně proměnlivé atmosféry jsou mikroby přítomné v půdě méně aktivní, což vytváří velmi odlišnou strukturu a dynamiku společenstva. Většina bakterií se v tomto prostředí nachází v nízkých koncentracích, a jsou obtížně kultivovatelné (Lebeis, 2015).

Existuje několik studií, které se zabývají složením mikrobiálního společenstva na povrchu vlastního kořene v lučním prostředí (Nunan *et al.*, 2005; Ridgway *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2008). Studie pracují především s horskými neovlivňovanými loukami a naznačují podobné výsledky. Nebyl potvrzen vztah mezi složením bakteriálního společenstva a rostlinnými druhy. Bylo ale ukázáno, že topografické parametry, pH (Singh *et al.*, 2008) a další environmentální faktory (Nunan *et al.*, 2005) jsou důležité a ovlivňují složení bakteriálního

společenstva. V kontrastu s tím byly potvrzeny významné interakce mezi rostlinnými druhy a složením společenstva hub (Ridgway *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2008). Je zřejmé, že uvnitř vlastních kořenů se endofytické společenstvo skládá pouze z omezeného a stabilního uskupení mikrobů, snižuje se zde tedy druhové složení a diverzita ve srovnání s rhizosférními společenstvy (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012). Nedávné studie lučních a zemědělských ekosystémů shrnuly, že rhizosféra obsahuje převážně kmeny Proteobacteria, Actinobacteria a Bacteroidetes (Ai *et al.*, 2015; Lundberg *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015).

Jak už bylo zmíněno, mikrobiální společenstva v nadzemních rostlinných tkáních, tedy v tzv. fylofěře, a společenstva kořenových systémů a rhizosféry vykazují značné rozdíly, což je částečně odrazem rozdílného okolního prostředí. Mikrobiální společenstva rostlinné fyloféry jsou charakteristická vysokou variabilitou, především díky změnám v okolních podmínkách a omezenému přístupu ke zdroji živin. Dále mají tato společenstva tendenci k nízké diverzitě ve srovnání s podzemními částmi (Obr. 5) (Bodenhausen *et al.*, 2013; Redford a Fierer, 2009).



Obr 5. Srovnání nadzemních a podzemních mikrobiomů rostlin. Mikrobiální společenstva rostlin mají relativně nízkou druhovou diverzitu s vysokou variabilitou. Rhizosférní mikrobiální společenstva jsou podstatně složitější než společenstva fyloféry a mohou být konzistentní i v rámci různých vzorků (převzato z Lebeis, 2015).

### 3 Cíle práce

Tato diplomová práce má za cíl popsat vztahy mezi diverzitou vegetace a diverzitou bakteriálního společenstva v půdě, kořenech, opadu a nadzemních částech rostlin a identifikovat faktory, které ovlivňují složení společenstva bakterií. Vztahy mezi vegetací a bakteriemi jsou studovány v lučném ekosystému s vysokou rostlinnou diverzitou a v horském lesním ekosystému.

#### **Dílčí cíle pro Experiment 1 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučném ekosystému**

- Identifikovat faktory, ovlivňující diverzitu bakteriálního společenstva v půdě, kořenech a nadzemních částech rostlin.
- Popsat taxonomické složení bakteriálního společenstev ve studovaných kompartmentech.
- Analyzovat vliv prostoru, složení vegetace a půdních parametrů na složení bakteriálního společenstva ve studovaných kompartmentech.

#### **Dílčí cíle pro Experiment 2 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému**

- Popsat vliv diverzity vegetace na diverzitu bakteriálního společenstva v opadu, půdě a kořenech rostlin v ekosystému temperátních horských lesů.
- Popsat taxonomické složení bakteriálních společenstev ve studovaných kompartmentech.
- Analyzovat vliv prostoru, složení vegetace a chemických parametrů prostředí na složení bakteriálního společenstva ve studovaných kompartmentech a porovnat různé přístupy k charakterizaci vegetace s ohledem na jejich predikční schopnosti.

### Pracovní hypotézy

Experiment 1 – Diverzita bakteriálního společenstva v půdě, kořenech a nadzemních částech rostlin stoupá s diverzitou vegetace na studované ploše. Nejsilnější vliv vegetace na diverzitu a složení společenstva bakterií bude v nadzemních částech rostlin a bude slábnout s přechodem od kořenů do půdy.

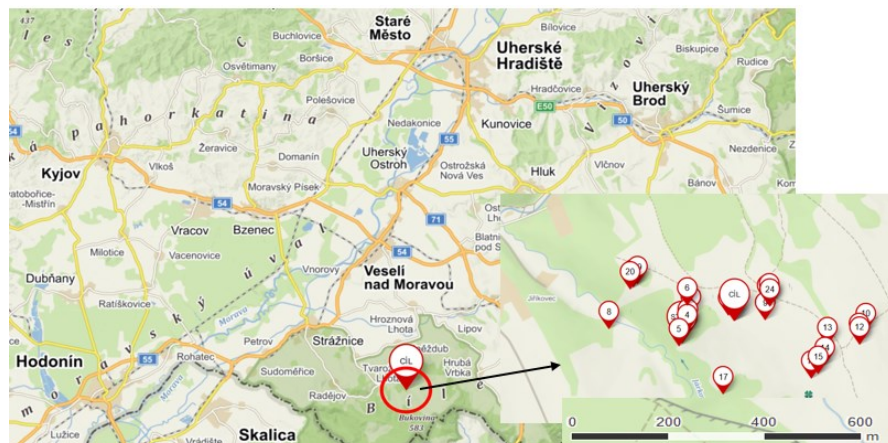
Experiment 2 – Diverzita bakteriálního společenstva v půdě, opadu a kořenech rostlin horského lesa stoupá s diverzitou vegetace. Složení společenstva bakterií je determinováno jak složením vegetace, tak chemickými charakteristikami prostředí.

## 4 Materiál a metody

### 4. 1 Experiment 1 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučném ekosystému

#### 4. 1. 1 Studované plochy a experimentální design

Studie probíhala v Národní přírodní rezervaci Čertoryje v Bílých Karpatech na východě České republiky (350-430 m.n.m) v oblasti reprezentující rozsáhlý komplex druhově bohatých květnatých luk (Obr. 6, 7).



Obr. 6: Lokace Národní přírodní rezervace Čertoryje.

Zdejší rostlinná diverzita dosahuje jednoho z nejvyšších počtů rostlinných druhů (Obr. 8) na Zemi zaznamenaných v prostorovém měřítku v rozmezí 0,1 až 49 m<sup>2</sup> (Wilson a Peet, 2012). Louky jsou vyvinuty na hlubokých mírně vápenatých půdách, které v případě nízkých letních srážek vysychají, kosí se jednou za rok v červnu nebo červenci jako součást ochrany přírody. Pro více podrobností viz. (Chytrý *et al.*, 2015; Jongepierová, 2008).



Obr. 7: Fotografie čertoryjských luk s vysokou krajinářskou hodnotou, velmi unikátní v celé střední Evropě (foto: Diana Navrátilová, 10. 6. 2015).



Obr. 8: Fotografie některých čertoryjských rostlin (převzato z Botanical Excursions in Moravia).

Odběr vzorků byl proveden v průběhu jednoho červnového dne v období před letním kosením. Dvacet pět čtvercových odběrových ploch o ploše 0,1 m<sup>2</sup> bylo vybráno pracovníky Masarykovy univerzity v Brně pod vedením Milana Chytrého tak, aby reprezentovaly co největší rozsah diverzity rostlin.



Obr. 9. Odběrová plocha číslo 1.

Odběrová místa se rozkládala v oblasti cca 1 km<sup>2</sup> a pokryla gradient rostlinné diverzity od 1 do 43 druhů. Pro každé odběrové místo byl zpracován seznam všech druhů cévnatých rostlin, a také byl zaznamenán počet rostlinných druhů na každém místě (Obr. 9). Na každém odběrovém místě byla odebrána (ostříhána) veškerá rostlinná biomasa. Dále byl odstraněn celý blok půdy (odběrového místa) až do hloubky 10 cm. Jak vegetace, tak i půdní bloky byly

transportovány do laboratoře, skladovány při teplotě 4 °C a zpracovány do pěti dnů. V laboratoři byly zpracovány vzorky nadzemní i podzemní (kořeny) rostlinné biomasy. Kořeny byly ručně odděleny od půdy, půda byla odstraněna promytím a byla zaznamenána čerstvá hmotnost biomasy kořenů. Půda byla proseta přes síto (5 mm), její objem byl postupně redukován kvartováním a byly odebrány dva dílčí směsné vzorky o hmotnosti 25 g. Nadzemní rostlinná část a kořeny byly nastříhány nůžkami na kusy <1 cm, důkladně promíchány a podvzorkovány na výsledný objem cca 50 ml. Vzorky ze všech tří kompartmentů byly lyofilizovány a uskladněny při -20°C. V půdních vzorcích byl stanoven obsah P, N, Ca, Mg, K, pH a poměr C:N. Obsah C byl stanoven v servisní laboratoři za použití oxidace kyselinou chromsírovou a obsah N byl měřen mineralizací kyseliny sírové s přidavkem selenu a síranu sodného a konverze na amonné ionty. Ostatní prvky byly měřeny po extrakci dle Mehlicha. Hodnota pH byla stanovena po smíchání 1g půdy s 10 ml destilované vody. Obsah půdní organické hmoty byl stanoven jako ztráta po žihání při 650 °C. Půdní vlhkost byla vypočtena jako rozdíl v hmotnosti před a po lyofilizaci.

#### **4. 1. 2 Molekulární analýzy**

Lyofilizované nadzemní rostlinné části a kořeny rostlin byly rozemlety na jemný prášek na kuličkovém oscilačním mlýnku (Retsch MM400). DNA z nadzemních částí a kořenů byla izolována kitem DNeasy Plant Maxi (Qiagen) a byly provedeny dvě DNA extrakce na vzorek za použití 250 mg vzorku v jedné extrakci. DNA z půdy byla extrahována modifikovanou metodou SK (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008) a opět byly provedeny dvě DNA extrakce na vzorek za použití 250 mg vzorku na jednu extrakci. Extrahovaná DNA byla následně přečištěna kitem GeneCleanTurbo (MP Biomedicals) a nezávislé DNA extrakty pro každý vzorek byly smíchány. Pro identifikaci bakterií byla použita PCR amplifikace části 16S s eubakteriálními primery 515F / 806R (Caporaso *et al.*, 2011). PCR amplifikace byly provedeny ve třech nezávislých PCR reakcích pro každý vzorek. PCR reakce obsahovaly 2,5 µl 10x pufru pro DNA polymerázu DyNAzyme II, 0,75 µl bovinního sérového albuminu (20 mg/ml), 1 µl každého primeru (0,01 mM), 0,5 µl směsi dNTP (každý 10 mM), 0,75 µl polymerázy (2 U/µl DyNAzyme II DNA polymerázy, 1:24 Pfu DNA polymerázy) a 1 µl templátové DNA. Podmínky cyklování byly 94 °C po dobu 5 minut, 35 cyklů (94 °C po dobu 1 minuty, 50 °C po dobu 1 minuty, 72 °C po dobu 1 minut) a závěrečná extenze při 72 °C po dobu 10 minut. Tři nezávislé PCR produkty každého vzorku byly smíchány a přečištěny za použití purifikačního kitu MinElute (Qiagen). Pro přípravu knihovny byly připraveny ekvimolární směsi ampliconů

s použitím TruSeq® DNA PCR-Free LT Kit (Illumina) a sekvenovány na platformě Illumina MiSeq (2×250 bází).

#### **4. 1. 3 Bioinformatická analýza a statistika**

Sekvenační data byla zpracována pomocí programu SEED 1.2.3 (Větrovský a Baldrian, 2013) pro vyhodnocování amplikonových sekvencí. Nejdříve byly pomocí „fastq-joining“ spojeny páry sekvencí (Aronesty, 2013), méně kvalitní konce sekvencí byly odstraněny. Chimerické sekvence byly detekovány pomocí programu UCHIME, který je zahrnut v Usearch 7.0.1090 (Edgar, 2010) a byly odstraněny. Výsledné sekvence byly seskupeny do operačních taxonomických jednotek (OTU) pomocí UPARSE implementovaného v rámci Usearch 7.0.1090 (Edgar, 2013) na hladině podobnosti 97%. Pro každou OTU byla vybrána nejčtenější sekvence a pomocí vyhledávání (BLASTn) v databázi GenBank byl identifikován nejbližší mikroorganismus na úrovni rodu nebo druhu; všechny nebakteriální sekvence byly odstraněny. Z každého vzorku bylo náhodně vybráno 8000 sekvencí a v tomto podvzorku byla stanovena alfa diverzita.

Všechny statistické analýzy byly provedeny v prostředí R s využitím balíčků vegan, nlme, betapart a ecodis (R Core Team, 2016). Ve všech případech byly rozdíly na hladině  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné, ty které byly v rozmezí  $0,05 < p < 0,10$  za marginálně významné.

Pro identifikaci hlavních prediktorů, které řídí diverzitu a bohatost bakteriálních společenstev ve studovaných kompartmentech byly použity obecné lineární modely (GLM). Jako prediktory variability byly použity chemické parametry půdy (C, N, P, Ca, Mg, K, C/N, C/P, N/P, pH, obsah půdní organické hmoty, vlhkost), rostlinná diverzita (počet druhů rostlin) a kořenová biomasa. Multikolinearita (vztah mezi jednotlivými proměnnými) byla prověřena a byl spočítán tzv. variance inflation factor (VIF), proměnné s  $VIF > 10$  nebyly do modelu zahrnuty. Do finálního modelu byly zahrnuty následující proměnné: vlhkost, P, N, C/N, pH, Mg, K, Ca, N/P a rostlinná diverzita (počet druhů rostlin) pro nadzemní části rostlin, plus hmotnost biomasy kořenů pro vzorky kořenů a půdy. Pro vytvoření modelů GLM byly použity postupně jeden až pět prediktorů. Nejlepší model byl vybrán podle korigovaného Akaike informačního kritéria (AICc). Kvalita nejlepšího modelu byla dále vyhodnocena zprůměrováním přes všechny modely, které spadají do 95% konfidenčního intervalu. Zda-li byla proměnná statisticky významná u více než 95 % modelů bylo určeno dle hodnoty nula



vyskytující se v intervalu. Pokud se nula v intervalu vyskytovala, proměnná nebyla považována za statisticky významnou.

Pro analýzu složení společenstev bakterií byly použity všechny bakteriální OTU s alespoň 20 sekvencemi v celém souboru dat. Zastoupení jednotlivých OTU mezi vzorky bylo standardizováno za použití Hellingerovy transformace a jako charakteristika podobnosti vzorků byla použita Bray-Curtis distance. Údaje o chemii půdy byly log-transformovány (s výjimkou pH) a pro statistickou analýzu byla použita Euklidovská distanční matice. Výsledné OTU matice a půdní matice byly použity v následných analýzách.

Pro vizualizaci rozdílů v bakteriálních společenstvech v nadzemních částech rostlin, v kořenech a v půdě byla použita ordinace NMDS (Non-metric multidimensional scaling) s použitím Bray-Curtis distance. Byl testován vliv kompartmentu a diverzity rostlin na odběrovém místě (počet rostlinných druhů) na složení bakteriálních společenstev s využitím PERMANOVY s 999 permutacemi pomocí funkce *adonis* v balíčku *vegan* a byla spočtena hodnota Adjusted  $R^2$ .

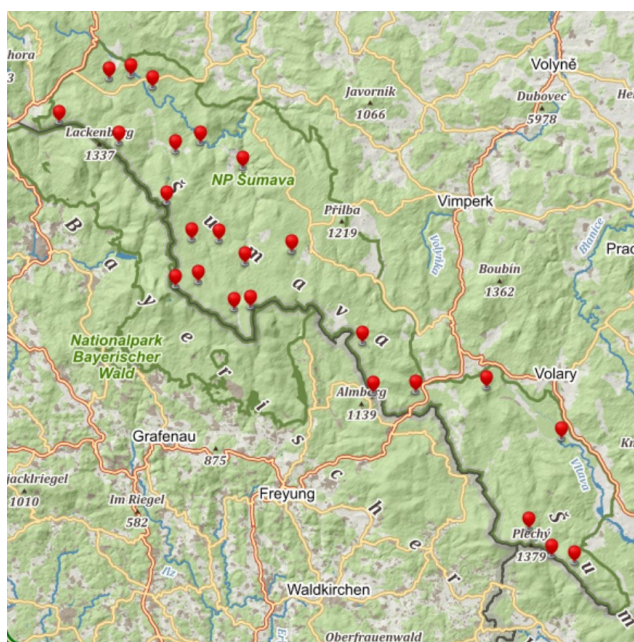
Pro popis prostoru byly sestrojeny PCNM (principal coordinates of neighbour matrices) vektory založené na geografické vzdálenosti mezi vzorky (Borcard a Legendre, 2002). Faktor prostoru byl potom reprezentován těmi PCNM vektory, které měly významný vztah ke složení bakteriálního společenstva. Půdní parametry byly charakterizovány PCA osami, které byly zkonstruovány na základě měřených půdních vlastností: obsah C, N, P, Ca, Mg, K, pH, půdní organická hmota a půdní vlhkost. První tři PCA osy vysvětlovaly 93% variability v datech (PC1 62%, PC2 17%, PC3 14%) a byly použity jako proxy pro půdní chemii. Matice pro složení společenstva rostlin (botanický průzkum se záznamem přítomných rostlinných druhů) byla použita pro výpočet distanční matice založené na Jaccardově distanci. Matice byla následně použita pro výpočet PCA os. První čtyři osy, které vysvětlovaly 62 % variability v datech (PC1 33%, PC2 14%, PC3 8%, PC4 7%) byly použity jako proxy pro vegetaci.

Pro popis vlivu hlavních faktorů ovlivňujících složení bakteriálního společenstva byla použita Variation partitioning analýza. Sestrojené PCNM a PCA vektory popsané výše byly použity jako proxy pro prostor, půdní parametry a složení vegetace. Variation partitioning analýza byla provedena pomocí funkce *VarPart* v balíčku *vegan* v prostředí R (Oksanen *et al.*, 2015). Funkce *VarPart* určuje procenta vysvětlené variability (Adjusted  $R^2$ ) pro hlavní faktory ovlivňující složení bakteriálního společenstva (Peres-Neto *et al.*, 2006). Společenstva v nadzemních částech rostlin, v kořenech, i v půdě byla analyzována samostatně. Význam dílčích segmentů byl testován pomocí RDA s 999 permutacemi.

## 4. 2 Experiment 2 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému

### 4. 2. 1 Experimentální plochy a design vzorkování

Studie probíhala v Národním parku Šumava, zahrnující oblast o rozloze 680,6 km<sup>2</sup> převážně pokrytou horským lesem. Bylo vybráno celkem 58 experimentálních ploch (Obr. 10, 11) rozmístěných na území celého Národního parku tak, aby reprezentovaly co nejširší spektrum diverzity stromového patra, gradient diverzity bylinného patra a dále co nejširší spektrum vlastností lesních půd. Pro každou experimentální plochu byly pracovníci Botanického ústavu AV ČR zpracovány přesné seznamy všech druhů rostlin v jednotlivých patrech vegetace, a byl zaznamenán počet rostlinných druhů na každé ploše. Pro přehlednost botanického snímku byla rozlišována čtyři rostlinná patra – mechové, bylinné, keřové a stromové. Složení a diverzita vegetace ve vzorcích kořenů byla analyzována rovněž pomocí sekvenace rostlinné DNA.



Obr. 10. Rozmístění některých experimentálních ploch v Národním parku Šumava.



Obr. 11. Fotografie několika vybraných experimentálních ploch v Národním parku Šumava.

Experimentální plochy byly voleny v oblastech, kde proběhl v uplynulých letech biomonitoring lesních ekosystémů, provedený NP Šumava (Dr. P. Starý, P. Čížková). Každou plochu tvořil kruh o poloměru 12,5 metru s alespoň osmi živými stromy. Vzorky půdy, opadu a kořenů rostlin byly odebrány pomocí osmi půdních sond vždy ve vzdálenosti 2 m od stromu, přičemž druhové zastoupení stromů odpovídalo druhovému složení všech stromů na každé ploše. Půdní sondy byly převezeny do laboratoře, uloženy ve 4 °C a během 24 hodin rozděleny na opad, svrchní vrstvu půdy do hloubky 10 cm a rostlinné kořeny z hloubky do 10 cm. Při zpracování půdních sond byl nejdříve separován opad, potom půda do hloubky 10 cm a byly odděleny kořeny. Půda byla proseta přes síto (5 mm), smíchána a byly odebrány dílčí vzorky, kořeny byly omyty, nastříhány a vysušeny na vzduchu, opad byl nastříhán na malé kousky (<1 cm) a důkladně promíchán. Vzorky ze všech tří kompartmentů byly lyofilizovány a uskladněny při -20°C. Ve vzorcích byl stanoven obsah C, N, pH, poměr C:N, obsah vody a půdní organická hmota. Obsah C byl stanoven v komerční laboratoři za použití oxidace kyselinou chromsírovou a obsah N byl měřen mineralizací kyseliny sírové s přidavkem selenu a síranu sodného a konverze na amonné ionty. Hodnota pH byla stanovena po smíchání 1g půdy s 10 ml destilované vody. Obsah půdní organické hmoty byl stanoven jako ztráta po žihání při 650 °C. Půdní vlhkost byla vypočtena jako rozdíl v hmotnosti před a po lyofilizaci.

#### 4. 2. 2 Molekulární analýzy

Lyofilizované kořeny byly rozemlety na jemný prášek na kuličkovém oscilačním mlýnku (Retsch MM400), byla z nich izolována DNA kitem DNeasy Plant Maxi (Qiagen) a byly provedeny dvě DNA extrakce na vzorek za použití 250 mg vzorku v jedné extrakci. DNA z půdy a opadu byla extrahována modifikovanou metodou SK (Sagova-Mareckova *et al.*, 2008) a byly provedeny tři DNA extrakce na vzorek za použití 250 mg vzorku na jednu extrakci. Extrahovaná DNA byla následně přečištěna kitem GeneCleanTurbo (MP Biomedicals) a nezávislé DNA extrakty pro každý vzorek byly smíchány. Pro identifikaci bakterií byla použita PCR amplifikace části 16S s eubakteriálními primery 515F / 806R (Caporaso *et al.*, 2011). PCR amplifikace byly provedeny ve třech nezávislých PCR reakcích pro každý vzorek. PCR reakce obsahovaly 2,5 µl 10x pufru pro DNA polymerázu DyNAzyme II, 0,75 µl bovinního sérového albuminu (20 mg/ml), 1 µl každého primeru (0,01 mM), 0,5 µl směsi dNTP (každý 10 mM), 0,75 µl polymerázy (2 U/µl DyNAzyme II DNA polymerázy, 1:24 Pfu DNA polymerázy) a 1 µl templátové DNA. Podmínky cyklování byly 94 °C po dobu 5 minut, 35 cyklů (94 °C po dobu 1 minuty, 50 °C po dobu 1 minuty, 72 °C po dobu 1 minut) a závěrečná extenze při 72 °C po dobu 10 minut. Identita rostlinných kořenu byla stanovena na základě sekvenace *trnL* regionu rostlin přítomného v chloroplastu. DNA kořenů byla amplifikována primery TrnC/TrnH (Taberlet *et al.*, 2007). PCR reakce obsahovaly 2,5 µl 10x pufru pro DNA polymerázu DyNAzyme II, 1,5 µl bovinního sérového albuminu (20 mg/ml), 1 µl každého primeru (0,01 mM), 0,5 µl směsi dNTP (každý 10 mM), 0,75 µl polymerázy (2 U/µl DyNAzyme II DNA polymerázy, 1:24 Pfu DNA polymerázy) a 1 µl templátové DNA. Podmínky cyklování byly 94 °C po dobu 5 minut, 26 cyklů (94 °C po dobu 1 minuty, 53 °C po dobu 1 minuty, 72 °C po dobu 1 minut) a závěrečná extenze při 72 °C po dobu 10 minut. Tři nezávislé PCR produkty každého vzorku byly smíchány a přečištěny za použití purifikačního kitu MinElute (Qiagen). Pro přípravu knihovny byly připraveny ekvimolární směsi amplikonů s použitím TruSeq® DNA PCR-Free LT Kit (Illumina) a sekvenovány na platformě Illumina MiSeq (2×250 bázi).

#### 4. 2. 3 Bioinformatická analýza a statistika

Sekvenační data byla zpracována pomocí programu SEED 1.2.3 (Větrovský a Baldrian, 2013) pro vyhodnocování amplikonových sekvencí. Celá bioinformatická analýza probíhala stejně jako v čertoryjském projektu. Vzorky byly podvzorkovány v případě půdy a opadu na 8000 náhodně zvolených sekvencí pro každý vzorek, v případě kořenů na 3000 sekvencí pro

každý vzorek, což bylo důležité pro stanovení bakteriální diverzity a dalších indexů diverzity, jako je např. Shannon-Wiener index diverzity. Všechny statistické analýzy byly provedeny v prostředí R s využitím balíčků vegan, nlme, betapart a ecodist (R Core Team, 2016). Ve všech případech byly rozdíly na hladině  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné, ty které byly v rozmezí  $0,05 < p < 0,10$  za marginálně významné.

Byly vyneseny závislosti Shannon-Wiener indexu diverzity a diverzity OTU (počet molekulárních druhů) na rostlinné diverzitě (počet rostlinných druhů). Tyto závislosti byly statisticky testovány pomocí lineárních korelací v R prostředí.

Dále byla provedena tzv. analýza indikátorových druhů v prostředí R, která identifikuje bakterie charakteristické pro půdu, opad a kořeny a byly vypočteny hodnoty specificity a fidelity. Pokud se hodnota specificity rovná 1, pak je OTU omezeno pouze na daný kompartment. Hodnota fidelity určuje, v jakém procentu vzorků z daného kompartmentu se konkrétní OTU nachází.

Analýza společenstev byla založena na bakteriálních OTU (operational taxonomic unit) vyskytujících se s 0,5% relativním zastoupením alespoň ve dvou vzorcích v celém datasetu. Relativní zastoupení OTU ve vzorcích byly standardizovány za použití Hellingerovy transformace a jako charakteristika podobnosti společenstev ve vzorcích byla použita Bray-Curtis distance. Údaje o chemismu půdy a opadu byly log-transformovány (s výjimkou pH) a pro statistickou analýzu byla použita Euklidovská distanční matice. Výsledné OTU matice, půdní a opadová matice byly použity v následných analýzách.

Pro vizualizaci rozdílů v bakteriálních společenstvech v půdě, v kořenech a v opadu byla použita NMDS (Non-metric multidimensional scaling) ordinace s použitím Bray-Curtis distance a pomocí funkce Adonis (PERMANOVA s užitím 999 permutací) byl otestován vliv kompartmentu a stanovena Adjusted  $R^2$  hodnota. Jako nadstavbová statistická funkce byl dále použit Pairwise Adonis pro stanovení odlišnosti mezi jednotlivými kompartmenty a byla stanovena Adjusted  $R^2$  hodnota.

Pro zobrazení vlivu chemie na složení bakteriálního společenstva v jednotlivých kompartmentech byla separátně opět použita NMDS ordinace s vnesením vektorů reprezentujících chemické parametry prostředí. V R prostředí byla také testována korelace těchto vektorů s PCA osami. Dále byla stanovena hodnota  $r^2$ , která zobrazuje míru korelace mezi vektory a osami.

Pro popis prostoru byly sestrojeny PCNM (principal coordinates of neighbour matrices) vektory založené na geografické vzdálenosti mezi experimentálními plochami (Borcard a Legendre, 2002). Faktor prostoru byl potom reprezentován těmi PCNM vektory, které měly

významný vliv na složení bakteriálního společenstva. Půdní a opadové parametry byly charakterizovány PCA osami, které byly zkonstruovány na základě měřených půdních a opadových vlastností: obsah C, N, pH a obsah vody pro opad a pro půdu ještě navíc obsah půdní organické hmoty. Byly testovány tři matice pro složení společenstva rostlin – botanický snímek se záznamem přítomných rostlinných druhů, snímek vzorkování dle rozložení dominantních stromů a zastoupení druhů či skupin rostlin v analyzovaných kořenech získané PCR amplifikací a analýzou markeru *trnL*. Tyto matice byly použity pro výpočet distančních matic založených na Jaccardově nebo Bray-Curtisově distanci užitých dle typu botanických dat. Matice byly následně použity pro výpočet PCA os a byly použity jako různá proxy reprezentující vegetaci. Shrnutí použitých vektorů i s vysvětlenou variabilitou viz. Tab. I.

Tab. I: Přehled použitých vektorů pro VarPart analýzu reprezentujících prostor, vegetaci a chemii.

	Testované rostlinné matice	PCNM prostor	PCA osy rostliny	PCA osy chemie
VarPart Půda	Vzorkované stromy	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 77,7 %, PC2 - 12,9 %, PC3 - 4,5 %	PC1 - 72,7 %, PC2 - 24,13 %, PC3 - 1,18 %
	Matice rostlinných kořenových markerů <i>trnL</i>	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 81,7 %, PC2 - 6,6 %, PC3 - 4,4 %, PC4 - 2,9 %	PC1 - 72,7 %, PC2 - 24,13 %, PC3 - 1,18 %
	Botanický snímek (všechny rostlinné druhy na ploše)	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 30,52 %, PC2 - 15,65 %, PC3 - 9,47 %, PC4 - 5,66 %	PC1 - 72,7 %, PC2 - 24,13 %, PC3 - 1,18 %
VarPart Kořeny	Vzorkované stromy	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 77,7 %, PC2 - 12,9 %, PC3 - 4,5 %	PC1 - 72,7 %, PC2 - 24,13 %, PC3 - 1,18 %
	Matice rostlinných kořenových markerů <i>trnL</i>	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 81,7 %, PC2 - 6,6 %, PC3 - 4,4 %, PC4 - 2,9 %	PC1 - 72,7 %, PC2 - 24,13 %, PC3 - 1,18 %
	Botanický snímek (všechny rostlinné druhy na ploše)	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 30,52 %, PC2 - 15,65 %, PC3 - 9,47 %, PC4 - 5,66 %	PC1 - 72,7 %, PC2 - 24,13 %, PC3 - 1,18 %
VarPart Opad	Vzorkované stromy	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 77,7 %, PC2 - 12,9 %, PC3 - 4,5 %	PC1 - 55,46 %, PC2 - 37,1 %, PC3 - 4,2 %
	Matice rostlinných kořenových markerů <i>trnL</i>	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 81,7 %, PC2 - 6,6 %, PC3 - 4,4 %, PC4 - 2,9 %	PC1 - 55,46 %, PC2 - 37,1 %, PC3 - 4,2 %
	Botanický snímek (všechny rostlinné druhy na ploše)	vektory 1,2,3,4,5,8,19,23	PC1 - 30,52 %, PC2 - 15,65 %, PC3 - 9,47 %, PC4 - 5,66 %	PC1 - 55,46 %, PC2 - 37,1 %, PC3 - 4,2 %

Pro popis vlivu hlavních faktorů ovlivňujících složení bakteriálního společenstva byla použita Variation partitioning analýza. Sestrojené PCNM a PCA vektory popsané výše byly použity jako proxy pro prostor, půdní a opadovou chemii a složení vegetace. Variation partitioning analýza byla provedena pomocí funkce VarPart v balíčku vegan v R prostředí (Oksanen *et al.*, 2015). Složení společenstev bakterií v půdě, v opadu i v kořenech byla analyzována samostatně. Význam dílčích segmentů byl testován pomocí RDA s 999 permutacemi.

## 5 Výsledky

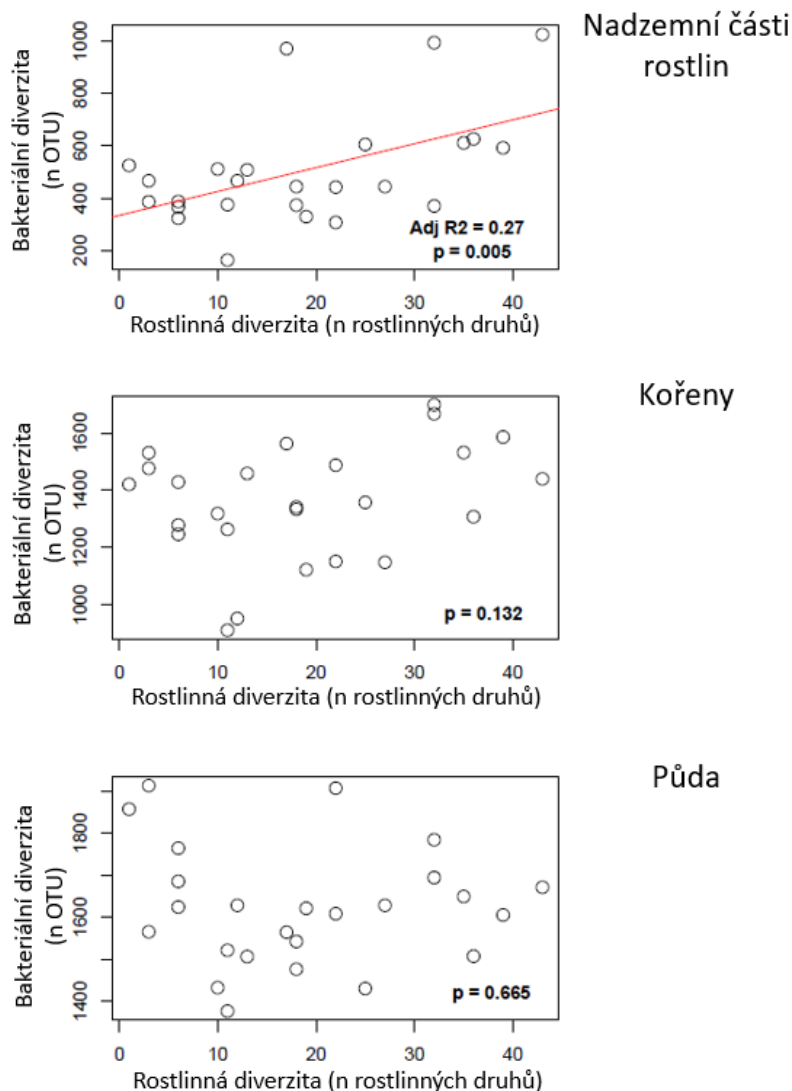
### 5. 1 Experiment 1 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučném ekosystému

#### 5. 1. 1 Vlastnosti půdy a vegetace

Luční půda v NPR Čertoryje byla mírně kyselá s pH mezi 5,4 a 6,8 a měla relativně malé rozdíly v obsahu N (0,5-0,9%) a poměru C / N (6,6-11,0). Lokality se však značně lišily v množství dostupného P v rozmezí od 2 do 20 ppm, poměry C / P a N / P se také značně lišily. Množství biomasy kořenů ve svrchních 10 cm půdy se pohybovalo mezi 0,4 a 4,0 kg/m<sup>2</sup> (Doplňková tabulka I). Podle vegetačního průzkumu se diverzita rostlinných druhů pohybovala od velmi nízkých hodnot (tři lokality s 1-3 druhy rostlin) až po velmi bohaté lokality (až 43 druhů rostlin na lokalitě). Zajímavé je, že vegetace byla poměrně variabilní a lokality s nízkou rostlinnou diverzitou většinou hostily různé rostlinné druhy. Trávy *Festuca rubra*, *Bromus erectus* a *Brachypodium pinnatum* se na lokalitách vyskytovaly nejčastěji (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.6943043.v1>).

#### 5. 1. 2 Diverzita a složení bakteriálního společenstva

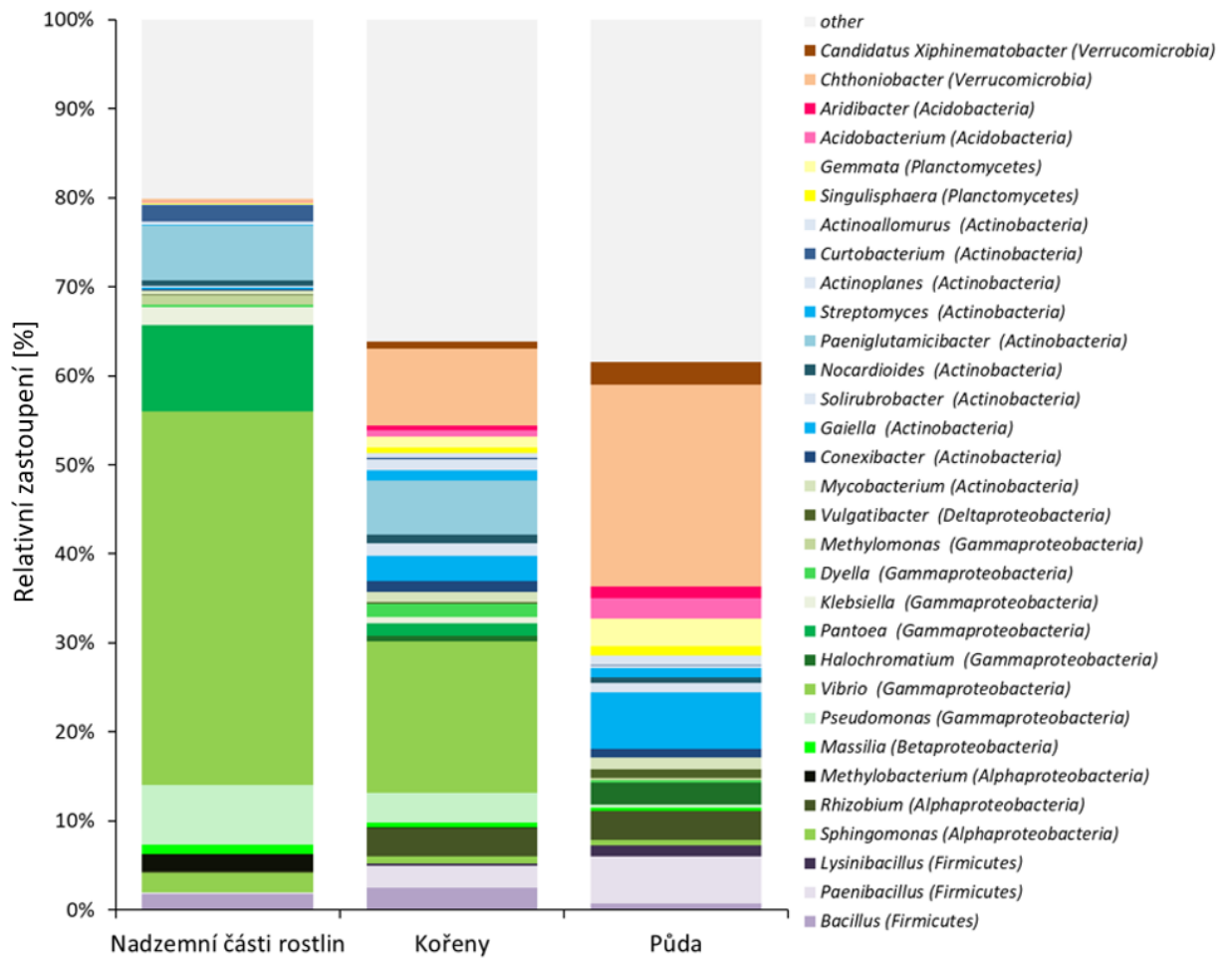
Po odstranění chimerických a nebakteriálních sekvencí z datasetu zbylo pro analýzu celkem 596 968 sekvencí bakteriální 16S rDNA, které byly seskupeny celkem do 19 423 OTU. Množství OTU ve vzorku nadzemních částí rostlin byl průměrně 504 (pohybovalo se v rozmezí 163 – 1025 OTU), v kořenech to bylo 1361 OTU (912 – 1699 OTU), v půdě 1622 OTU (1376 – 1913 OTU). Dle výsledků GLM žádná z testovaných environmentálních proměnných neovlivňovala bakteriální diverzitu ani v kořenech, ani v půdě, avšak bakteriální diverzita v nadzemních rostlinných částech významně korelovala ( $p = 0,005$ ) s diverzitou rostlin. Vztah mezi rostlinnou diverzitou a bakteriální diverzitou v nadzemních částech rostlin byl pozitivní a vysvětloval 27% variability v datech. Kromě rostlinné diverzity žádná z testovaných proměnných neovlivňovala bakteriální diverzitu v nadzemních částech rostlin (Obr. 12).



Obr. 12: Závislost mezi bakteriální diverzitou (počtem OTU) a rostlinnou diverzitou (počet rostlinných druhů) v nadzemních částech rostlin, kořenech a půdě.

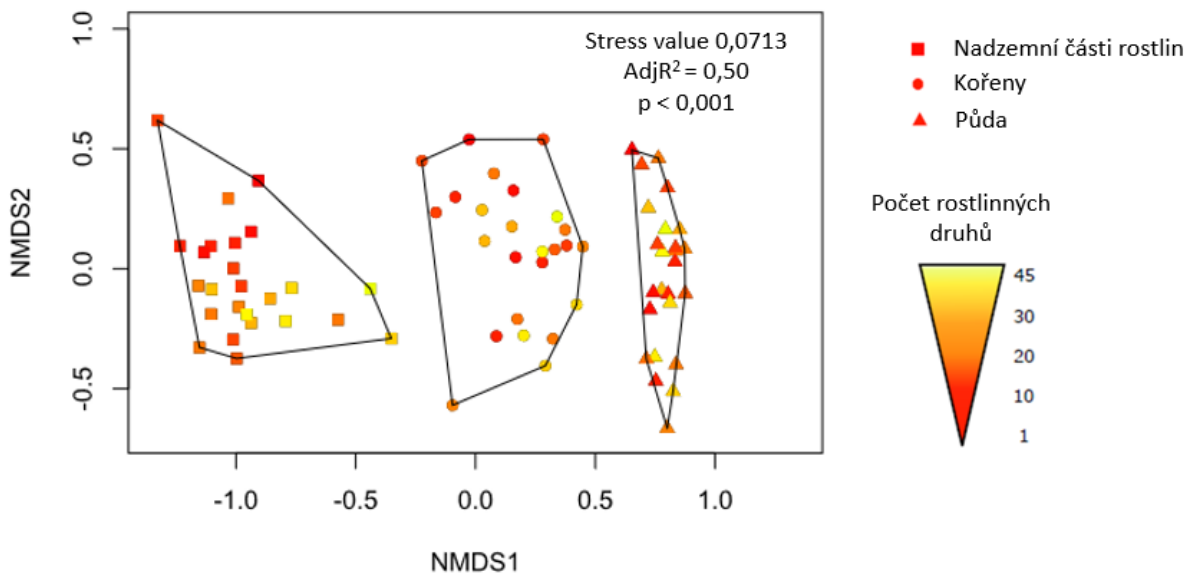
Bakteriální sekvence patřily hlavně kmenu Proteobacteria (konkrétně 67,1% v nadzemních částech rostlin, 29,3% v kořenech a 8,6% v půdě) a kmenu Actinobacteria (konkrétně 10,1% v nadzemních částech rostlin, 16,7% v kořenech a 12,7% v půdě). Především v kořenech a v půdě byl také významný kmen Verrucomicrobia (konkrétně 9,4% v kořenech a 25,5% v půdě). U nadzemních částí rostlin byly nejvíce zastoupeny bakteriální rody *Vibrio*, *Pantoea* a *Pseudomonas*, které patří do třídy Gammaproteobacteria. U kořenů byly nejvíce zastoupeny bakteriální rody *Vibrio*, *Chthoniobacter* (kmen Verrucomicrobia) a *Paeniglutamibacter* (kmen Actinobacteria). V půdě byly nejvíce zastoupeny bakteriální rody *Chthoniobacter*, *Gaiella* (kmen Actinobacteria) a *Paenibacillus* (kmen Firmicutes) (Obr. 13).





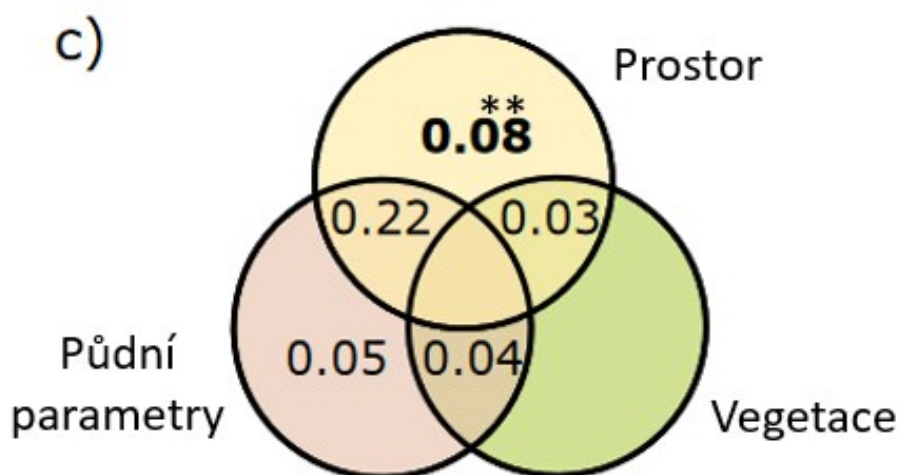
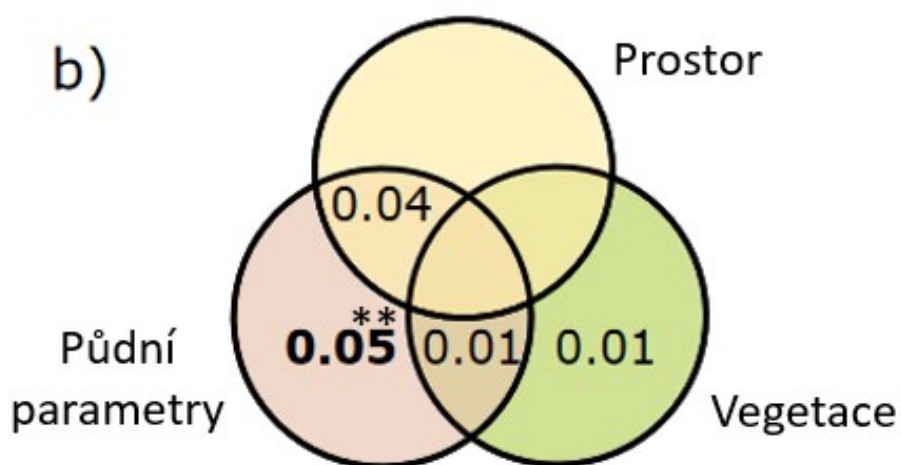
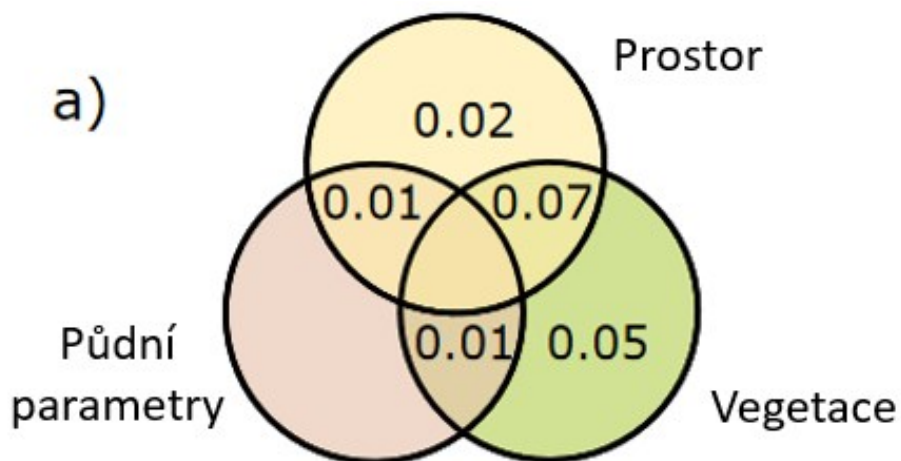
Obr. 13: Relativní zastoupení dominantních bakteriálních rodů v nadzemních částech rostlin, kořenech a půdě.

NMDS ordinace ukázala jasnou odlišnost v bakteriálních společenstvech mezi jednotlivými habitaty (Obr. 14). Byl potvrzen silný vliv habitatu (PERMANOVA,  $p < 0,001$ ) vysvětlující až 50% variability ve složení bakteriálního společenstva. Nebyl detekován žádný jasný vliv rostlinné diverzity na složení společenstva ( $p = 0,213$ ).



Obr. 14: Rozdíly ve složení bakteriálního společenstva v nadzemních částech rostlin, v kořenech a v půdě, zobrazení pomocí NMDS diagramu (body v diagramu ukazující složení na úrovni jedné lokality).

Bakteriální společenstva byla prostorově strukturovaná. PCNM vektory jedna, dva a čtyři, vyjadřující prostorové vztahy mezi vzorky, významně korelovaly se složením bakteriálního společenstva v nadzemních částech rostlin, v kořenech a v půdě. Tyto vektory byly následně použity pro Variation partitioning (Obr. 15). Ačkoliv tato analýza neodhalila významné účinky žádného z testovaných faktorů, faktory prostoru a vegetace společně vysvětlovaly 14% variability ve složení společenstva v nadzemních částech rostlin. Půdní parametry byly významným prediktorem složení bakteriálního společenstva v kořenech, kde vysvětlovaly 5% celkové variability ( $p = 0,035$ ). Čistý vliv prostoru či vegetace nebyl v kořenech zaznamenán, ačkoliv půdní parametry a prostor společně vysvětlovali 9% variability ve složení bakteriálního společenstva v kořenech. Dále analýza vysvětlila vysokou celkovou variabilitu (42%) ve složení půdních bakteriálních společenstev. Většina vysvětlené variability (35%) byla však připisována kombinaci půdní chemie a prostorové distribuce.



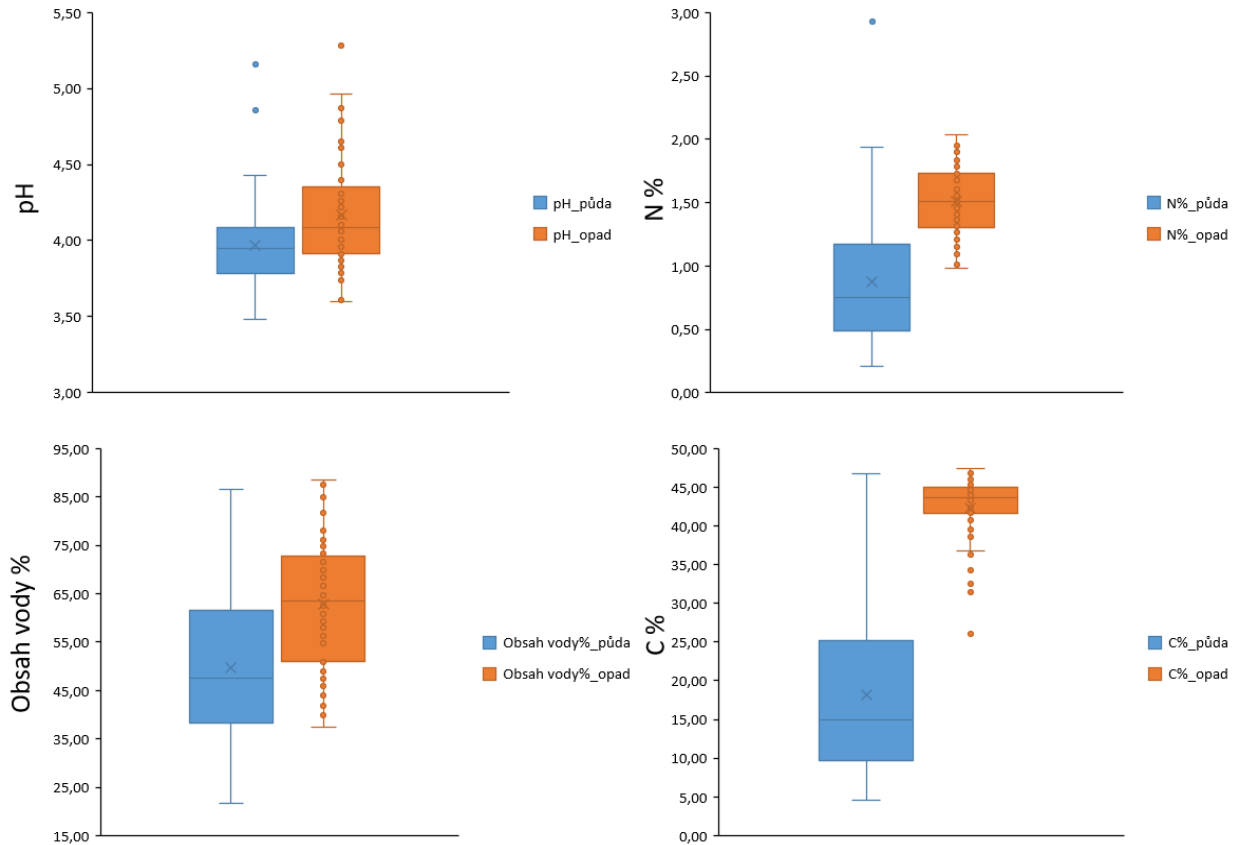
Obr. 15: Variation partitioning analýza vlivu prostoru, vegetace a půdních parametrů na složení společenstva bakterií v lučních ekosystémech. Hodnoty v grafu zvýrazněné tučně\*\* jsou statisticky významné (a - nadzemní části rostlin, b - kořeny, c - půda).

## 5. 2 Experiment 2 – Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému

### 5. 2. 1 Vlastnosti půdy, opadu a vegetace

Lesní půdy v Národním parku Šumava byly rozdílné jak po chemické stránce, tak vegetací. Půda byla kyselá s pH v rozmezí 3,5 až 5,2, měla relativně velké rozdíly v obsahu C (4,6-46,7 %) a N (0,2-2,9 %). Lokality se také velmi lišily v obsahu organické hmoty 3,8-96,6 % a obsahu vody 21,8-86,5 % (tato hodnota však zřejmě v čase kolísá). U opadu se pH pohybovalo v rozmezí 3,6-5,3. Obsah C kolísal mezi 26,0-42,8%, obsah N mezi 1-2 % a obsah vody mezi 37,5-88,5% (Doplňková tabulka II. a Obr. 16). Počet rostlinných druhů na plochách dosahoval jak nízkých hodnot (dvě plochy s 8 a 11 rostlinnými druhy), tak hodnot velmi vysokých (s 52-72 rostlinnými druhy na ploše). Jednotlivá rostlinná patra přes všechny experimentální plochy byla složena z různých druhů rostlin. Mechové patro se skládalo z 20 druhů rostlin, bylinné patro se skládalo ze 182 druhů rostlin, stromové patro z 12 druhů stromů.

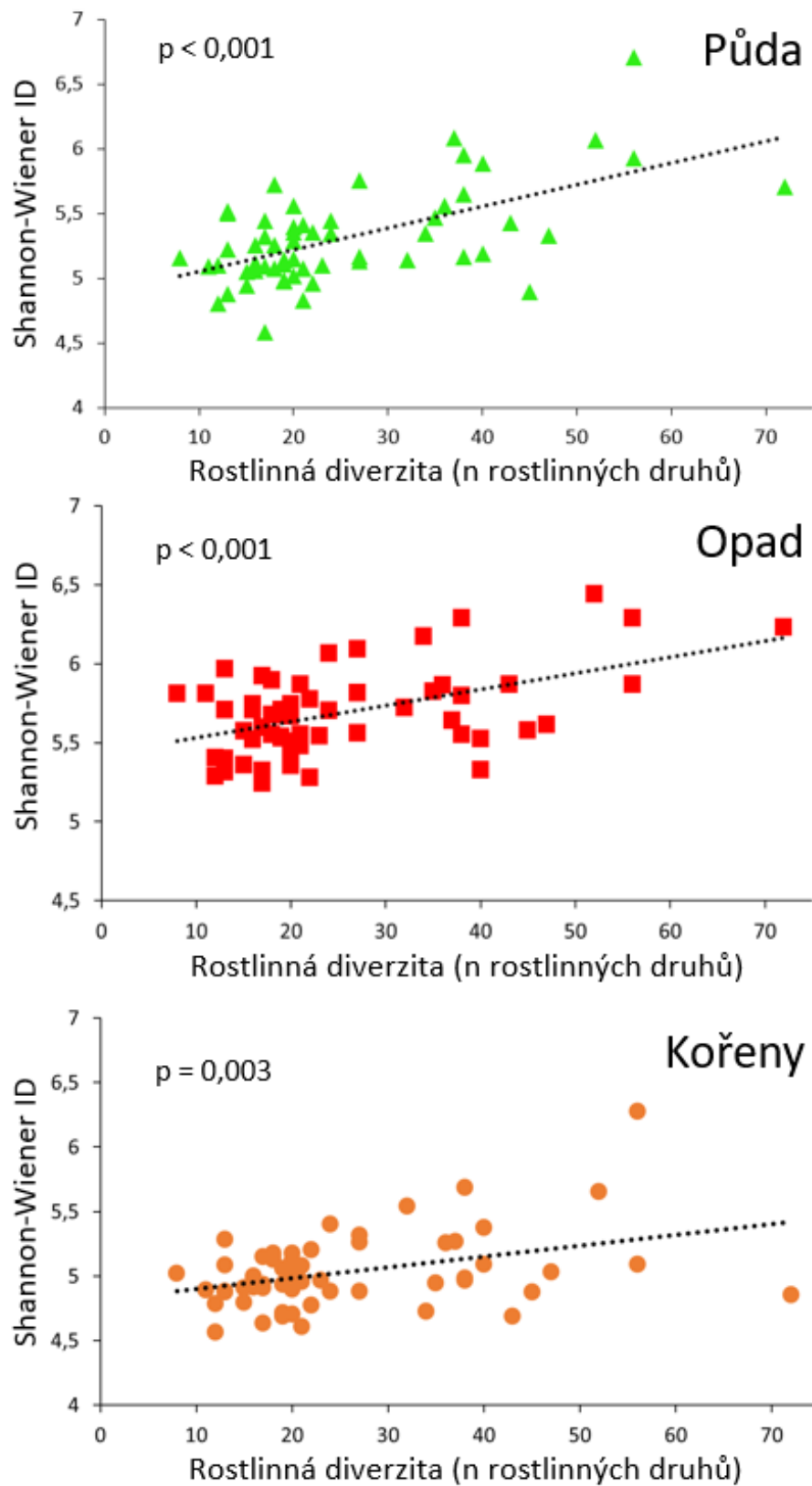
Kromě smrku ztepilého (*Picea abies*) byly nejčastěji se vyskytující stromy buk lesní (*Fagus sylvatica*) a borovice lesní (*Pinus sylvestris*). Nejčastěji vyskytující se rostlinné druhy bylinného patra byly brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) a třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa*). Mezi nejčastější mechy patřily dvouhrotec (*Dicranum sp.*) a ploník (*Polytrichum sp.*) (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.6943055.v1>).



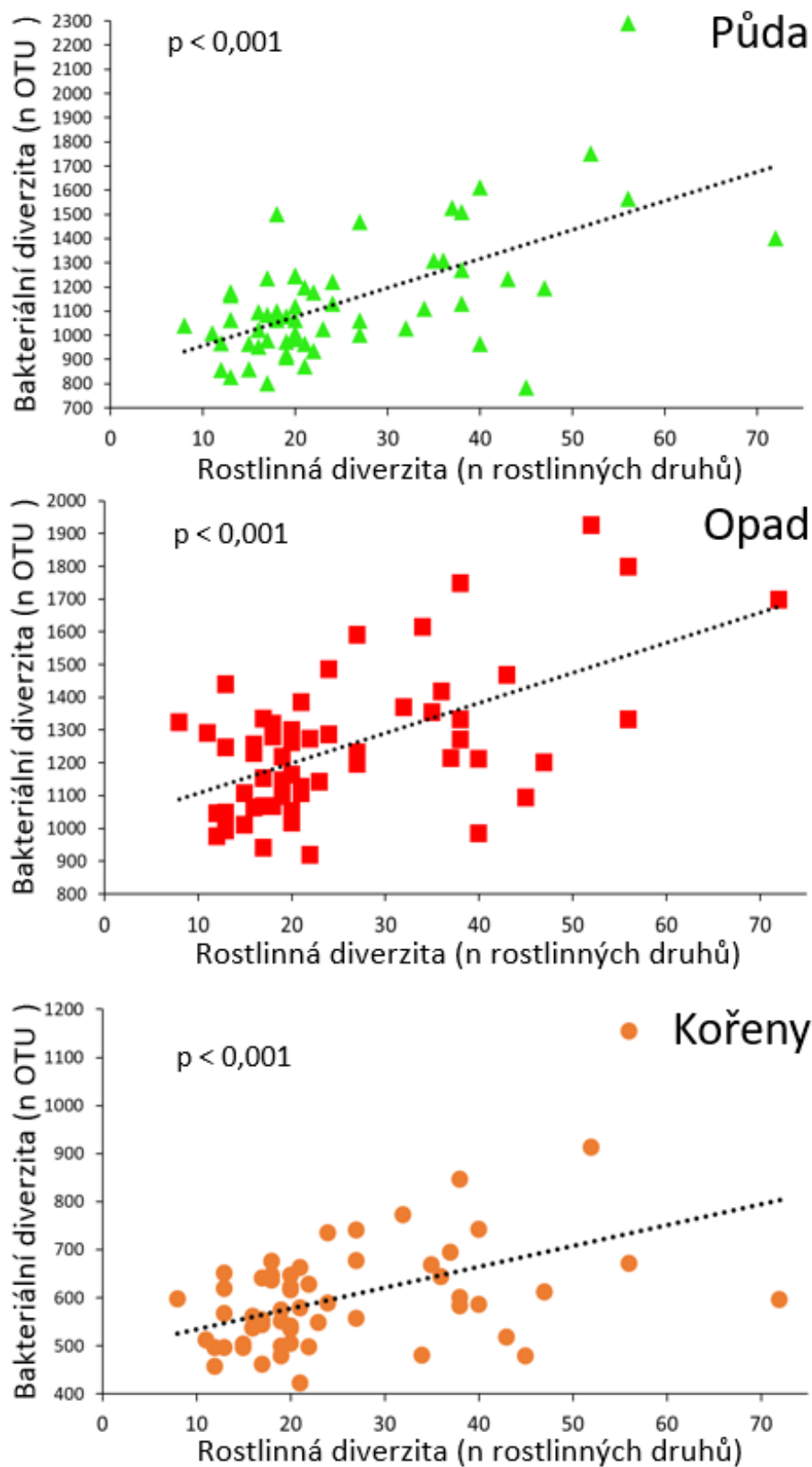
Obr. 16: Chemické parametry a obsah vody pro půdu a opad.

### 5. 2. 2 Diverzita a složení bakteriálního společenstva

Z původního datasetu 3 209 867 sekvencí bylo po odstranění chimerických a nebakteriálních sekvencí (zejména 16S sekvence rostlinných plastidů v kořenech) celkem získáno 2 156 044 sekvencí bakteriální 16S rDNA, které byly seskupeny do 28 746 OTU. Po podvzorkování datasetu byla stanovena průměrná bakteriální diverzita v jednotlivých kompartmentech a byly spočteny indexy diverzity. Při vynesení závislosti Shannon-Wienerova indexu diverzity na rostlinné diverzitě, a stejně tak při vynesení závislosti počtu OTU na rostlinné diverzitě, byla potvrzena významná korelace ve všech třech habitatech (Obr. 17, Obr. 18). Vztah mezi rostlinnou diverzitou a bakteriální diverzitou byl pozitivní v kořenech, v opadu i v půdě.

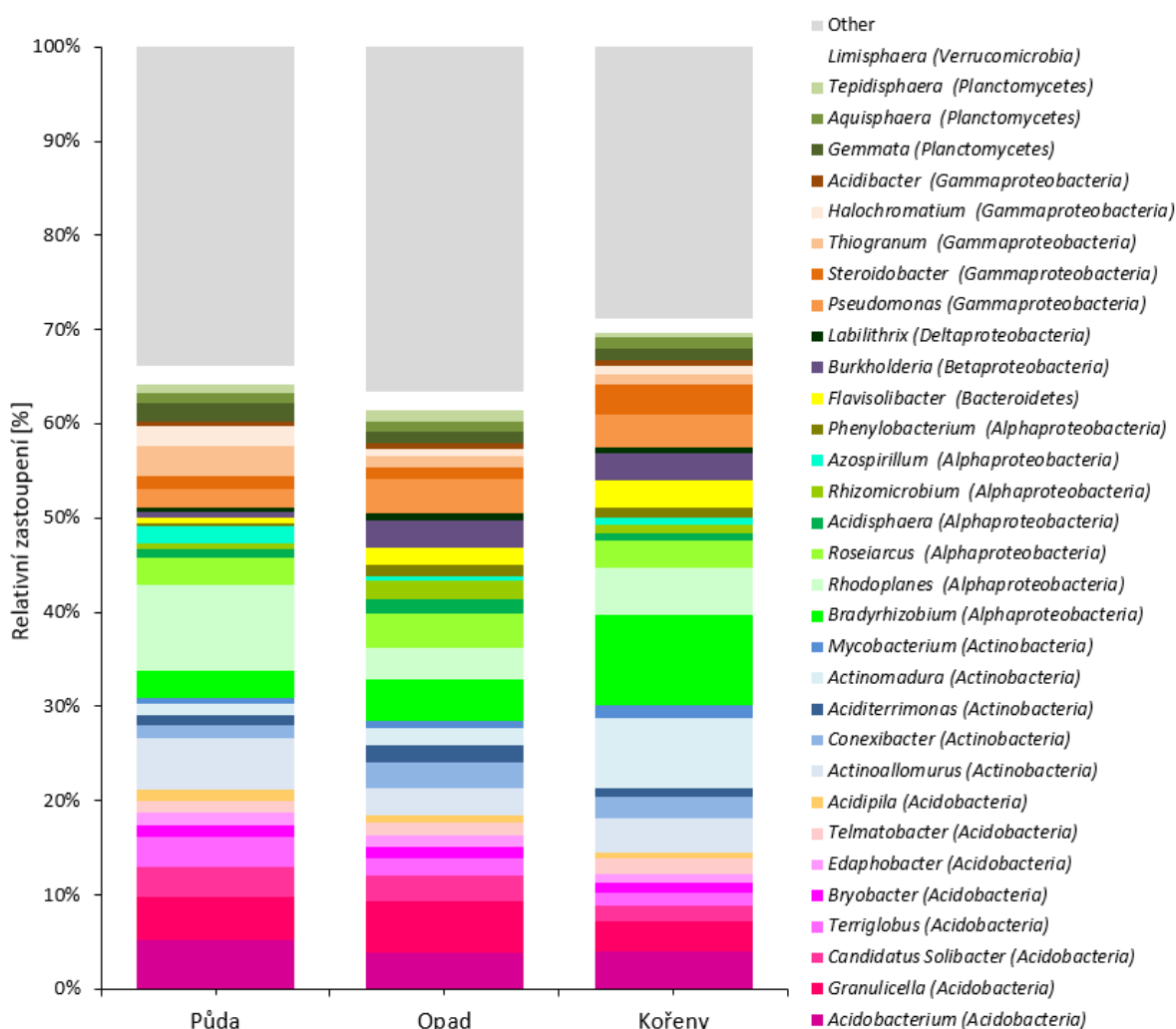


Obr. 17: Závislost Shannon-Wiener indexu diverzity na rostlinné diverzitě (n rostlinných druhů) v půdě, opadu a kořenech.



Obr. 18: Závislost bakteriální diverzity (n OTU) na rostlinné diverzitě (n rostlinných druhů) v půdě, opadu a kořenech.

Bakteriální sekvence patřily hlavně do kmene Proteobacteria (konkrétně 28,8% v půdě, 27,7% v opadu a 33,7% v kořenech), Acidobacteria (21,2% v půdě, 18,5% v opadu a 14,4% v kořenech) a Actinobacteria (konkrétně 9,7% v půdě, 10% v opadu a 15,7% v kořenech). V půdě byly nejvíce zastoupeny bakteriální rody *Rhodoplanes* (Alphaproteobacteria), *Actinoallomurus* a *Acidobacterium*. U kořenů byly nejvíce zastoupeny rody *Bradyrhizobium* (Alphaproteobacteria), *Actinomadura* a *Rhodoplanes*, v opadu to byly rody *Granulicella* (Acidobacteria), *Bradyrhizobium* a *Acidobacterium* (Obr. 19).



Obr. 19: Relativní zastoupení dominantních bakteriálních rodů v půdě, v opadu a v kořenech.



Provedená analýza indikátorových druhů naznačila, které bakterie se specificky vyskytují v daném habitatu (Tab. II, III, IV). V půdě se jednalo především o abundantní bakterie z kmene Acidobacteria a Proteobacteria. V opadu bylo spektrum specifických bakteriálních kmenů širší, v kořenech to byly hlavně Actinobacteria, Bacteroidetes a Proteobacteria. Za zmínku dále stojí tyto bak. rody vyznačené v tabulkách, které patří v daném habitatu mezi četné a jsou charakteristické vysokými hodnotami specificity (hodnota specificity rovná 1, pak je OTU omezeno pouze na daný kompartment) a fidelity (určuje v jakém procentu vzorků z daného kompartmentu se konkrétní OTU nachází). Pro půdu se jedná o bakteriální rody *Desulfomonile* a *Thermogemmatispora*, pro opad se jedná o *Frigoribacterium*, *Mucilaginibacter* a *Thermosinus*, pro kořeny potom o *Nocardia*, *Enterococcus*, *Actinospica* a *Actinomadura*.

Tab. II: Bakteriální OTU, specifické pro půdu.

OTU	Kmen	Rod	Specificita	Fidelita	p hodnota	Půda (abundance %)	Opad (abundance %)	Kořeny (abundance %)
CL00116	Proteobacteria	<i>Desulfomonile</i>	0.9276	0.9310	0.0001***	0,31	0,01	0,01
CL00198	Proteobacteria	<i>Wenzhouxiangella</i>	0.9073	0.7931	0.0001***	0,16	0,00	0,01
CL00126	Chloroflexi	<i>Thermogemmatispora</i>	0.8897	0.7759	0.0001***	0,30	0,01	0,03
CL00187	Proteobacteria	<i>Crenothrix</i>	0.8740	0.9310	0.0001***	0,18	0,00	0,02
CL00167	Proteobacteria	<i>Steroidobacter</i>	0.8641	0.7241	0.0001***	0,20	0,01	0,02
CL00096	Proteobacteria	<i>Desulfomonile</i>	0.8396	1.0000	0.0001***	0,39	0,04	0,04
CL00171	Chloroflexi	<i>Thermogemmatispora</i>	0.8341	0.7414	0.0001***	0,23	0,02	0,03
CL00094	Proteobacteria	<i>Steroidobacter</i>	0.8298	0.8966	0.0001***	0,39	0,02	0,06
CL00016	Proteobacteria	<i>Desulfomonile</i>	0.8096	1.0000	0.0001***	2,09	0,30	0,20
CL00036	Proteobacteria	<i>Azospirillum</i>	0.7957	1.0000	0.0001***	0,97	0,10	0,15
CL00087	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	0.7675	0.9310	0.0001***	0,40	0,09	0,03
CL00217	Proteobacteria	<i>Methylobacter</i>	0.7622	0.8793	0.0001***	0,16	0,01	0,04
CL00120	Proteobacteria	<i>Azospirillum</i>	0.7397	0.8448	0.0001***	0,27	0,01	0,08
CL00063	Firmicutes	<i>Ruminococcus</i>	0.7248	1.0000	0.0001***	0,52	0,08	0,12
CL00110	Proteobacteria	<i>Desulfomonile</i>	0.7143	1.0000	0.0001***	0,30	0,07	0,05
CL00106	Verrucomicrobia	<i>Terrimicrobium</i>	0.6965	0.7414	0.0001***	0,35	0,06	0,09
CL00080	Proteobacteria	<i>Pseudolabrys</i>	0.6934	0.9828	0.0001***	0,39	0,09	0,08
CL00068	Verrucomicrobia	<i>Terrimicrobium</i>	0.6764	0.9138	0.0001***	0,46	0,13	0,09
CL00151	Proteobacteria	<i>Thiodictyon</i>	0.6755	0.9655	0.0001***	0,20	0,05	0,05
CL00169	Planctomycetes	<i>Gemmata</i>	0.6733	0.9655	0.0001***	0,18	0,03	0,05
CL00192	Proteobacteria	<i>Stella</i>	0.6696	0.7414	0.0001***	0,16	0,01	0,07
CL00082	Proteobacteria	<i>Sedimenticola</i>	0.6496	0.9828	0.0001***	0,36	0,14	0,06
CL00128	Proteobacteria	<i>Pseudolabrys</i>	0.6489	0.9828	0.0001***	0,26	0,06	0,09
CL00020	Proteobacteria	<i>Methylobacter</i>	0.6427	1.0000	0.0001***	1,56	0,22	0,64
CL00038	Acidobacteria	<i>Acidipila</i>	0.6386	1.0000	0.0001***	0,79	0,27	0,18
CL00118	Proteobacteria	<i>Halochromatium</i>	0.6322	1.0000	0.0001***	0,26	0,08	0,07
CL00019	Acidobacteria	<i>Acidobacterium</i>	0.6269	1.0000	0.0001***	1,73	0,37	0,66
CL00010	Acidobacteria	<i>Terriglobus</i>	0.6233	1.0000	0.0001***	2,63	0,63	0,95

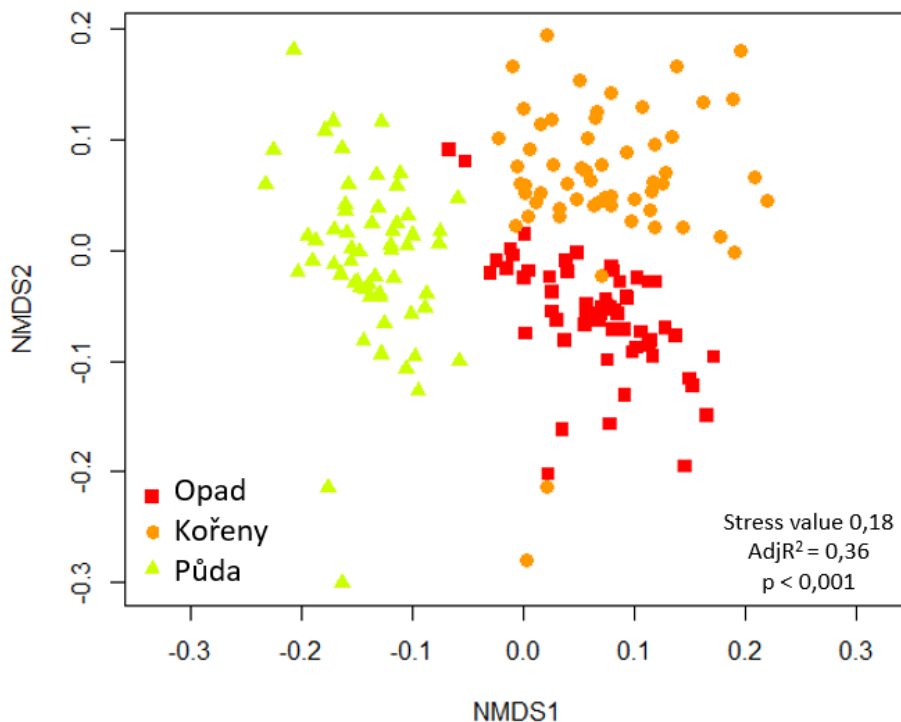
Tab. III: Bakteriální OTU, specifické pro opad.

OTU	Kmen	Rod	Specificita	Fidelita	p hodnota	Půda (abundance %)	Opad (abundance %)	Kořeny (abundance %)
CL00123	Firmicutes	<i>Caldicoprobacter</i>	0.8535	0.6034	0.0001***	0,04	0,34	0,02
CL00058	Actinobacteria	<i>Frigoribacterium</i>	0.8431	1.0000	0.0001***	0,02	0,72	0,11
CL00182	Acidobacteria	<i>Edaphobacter</i>	0.8405	0.9828	0.0001***	0,01	0,21	0,03
CL00247	Actinobacteria	<i>Solirubrobacter</i>	0.8281	0.8621	0.0001***	0,00	0,16	0,03
CL00114	Actinobacteria	<i>Jatrophihabitans</i>	0.8254	0.9828	0.0001***	0,01	0,36	0,06
CL00042	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	0.8052	1.0000	0.0001***	0,05	0,93	0,18
CL00161	Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i>	0.8049	0.8966	0.0001***	0,01	0,21	0,05
CL00074	Firmicutes	<i>Thermosinus</i>	0.7786	1.0000	0.0001***	0,09	0,52	0,06
CL00108	Proteobacteria	<i>Variovorax</i>	0.7765	0.9655	0.0001***	0,03	0,36	0,08
CL00088	Acidobacteria	<i>Granulicella</i>	0.7693	1.0000	0.0001***	0,03	0,44	0,10
CL00219	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0.7475	0.9138	0.0001***	0,01	0,19	0,05
CL00191	Actinobacteria	<i>Actinoallomurus</i>	0.7089	0.9655	0.0001***	0,03	0,20	0,05
CL00143	Acidobacteria	<i>Granulicella</i>	0.6954	1.0000	0.0001***	0,01	0,27	0,11
CL00104	Acidobacteria	<i>Granulicella</i>	0.6584	1.0000	0.0001***	0,04	0,36	0,14
CL00154	Verrucomicrobia	<i>Limisphaera</i>	0.6555	0.9138	0.0001***	0,05	0,17	0,04
CL00129	Firmicutes	<i>Desulfotomaculum</i>	0.6413	1.0000	0.0001***	0,09	0,26	0,05
CL00071	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	0.6407	1.0000	0.0001***	0,04	0,45	0,22
CL00148	Acidobacteria	<i>Granulicella</i>	0.6331	1.0000	0.0001***	0,02	0,24	0,12
CL00091	Proteobacteria	<i>Candidatus_Stammeru</i>	0.6296	0.9483	0.0001***	0,13	0,36	0,08
CL00055	Bacteroidetes	<i>Mucilaginibacter</i>	0.6254	1.0000	0.0001***	0,12	0,60	0,24
CL00024	Acidobacteria	<i>Terriglobus</i>	0.6005	1.0000	0.0001***	0,46	1,20	0,34

Tab. IV: Bakteriální OTU, specifické pro kořeny.

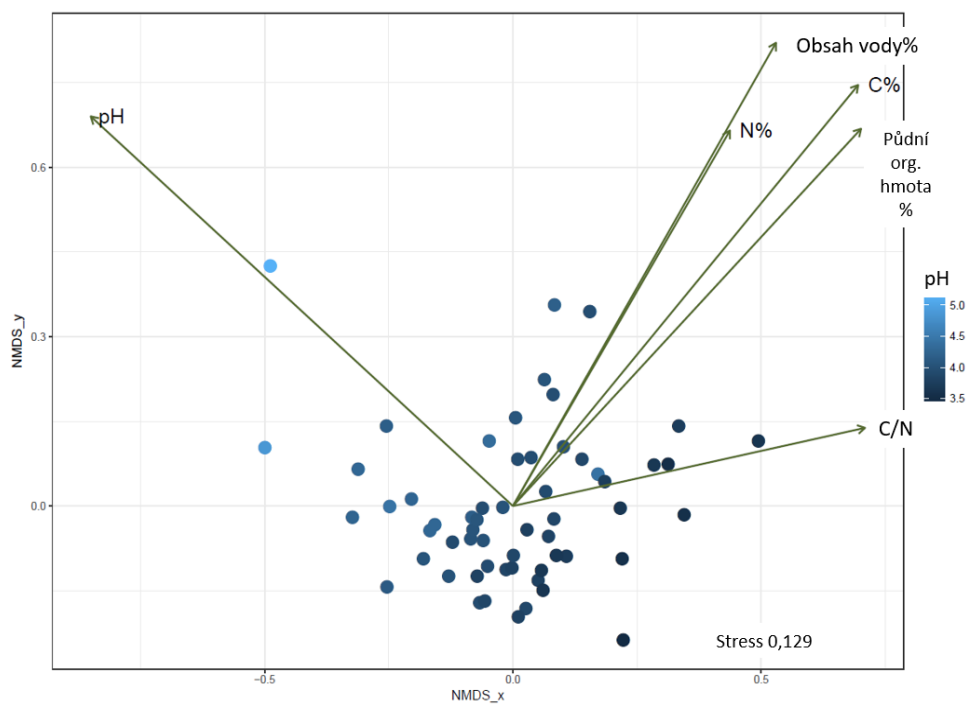
OTU	Kmen	Rod	Specificita	Fidelita	p hodnota	Půda (abundance %)	Opad (abundance %)	Kořeny (abundance %)
CL00227	Actinobacteria	<i>Nocardia</i>	0.96606	0.86207	0.0001***	0,01	0,01	0,43
CL00156	Firmicutes	<i>Enterococcus</i>	0.95695	0.77586	0.0001***	0,02	0,01	0,70
CL00328	Synergistetes	<i>Aminomonas</i>	0.95308	0.70690	0.0001***	0,01	0,01	0,26
CL00257	Proteobacteria	<i>Steroidobacter</i>	0.92859	0.98276	0.0001***	0,01	0,02	0,38
CL00274	Verrucomicrobia	<i>Persicirhabdus</i>	0.90115	0.81034	0.0001***	0,00	0,04	0,35
CL00437	Proteobacteria	<i>Nitrospirillum</i>	0.89565	0.94828	0.0001***	0,01	0,01	0,19
CL00266	Actinobacteria	<i>Sinosporangium</i>	0.87677	0.94828	0.0001***	0,01	0,02	0,27
CL00356	Actinobacteria	<i>Actinoallomurus</i>	0.87102	0.89655	0.0001***	0,01	0,03	0,22
CL00163	Actinobacteria	<i>Actinomadura</i>	0.85622	0.87931	0.0001***	0,04	0,04	0,45
CL00073	Actinobacteria	<i>Actinospica</i>	0.85602	1.00000	0.0001***	0,03	0,17	1,20
CL00041	Actinobacteria	<i>Actinomadura</i>	0.84949	1.00000	0.0001***	0,16	0,22	2,13
CL00371	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	0.84934	0.75862	0.0001***	0,00	0,03	0,19
CL00345	Proteobacteria	<i>Lacibacterium</i>	0.84144	0.87931	0.0001***	0,03	0,01	0,20
CL00117	Proteobacteria	<i>Aquaspirillum</i>	0.77583	1.00000	0.0001***	0,06	0,10	0,56
CL00183	Bacteroidetes	<i>Chitinophaga</i>	0.72915	0.93103	0.0001***	0,01	0,11	0,31
CL00012	Actinobacteria	<i>Actinomadura</i>	0.68541	1.00000	0.0001***	0,47	1,24	3,73
CL00029	Proteobacteria	<i>Steroidobacter</i>	0.68319	1.00000	0.0001***	0,42	0,45	1,88
CL00175	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	0.65293	0.93103	0.0001***	0,03	0,13	0,30
CL00251	Firmicutes	<i>Desulfotomaculum</i>	0.64674	0.98276	0.0001***	0,02	0,09	0,19
CL00018	Bacteroidetes	<i>Flavisolibacter</i>	0.61820	1.00000	0.0001***	0,29	1,36	2,67

NMDS ordinace (Obr. 20) ukázala odlišnost v bakteriálních společenstvech mezi jednotlivými habitaty a tento silný vliv byl potvrzen PERMANOVou ( $p < 0,001$ ) vysvětlující až 36% variability ve složení bakteriálního společenstva. Rozdíly byly významné jak mezi půdou a opadem ( $p = 0,001$ ,  $\text{AdjR}^2 = 34,8\%$ ), tak mezi půdou a kořeny ( $p = 0,001$ ,  $\text{AdjR}^2 = 31,8\%$ ) i mezi opadem a kořeny ( $p = 0,001$ ,  $\text{AdjR}^2 = 21,6\%$ ).

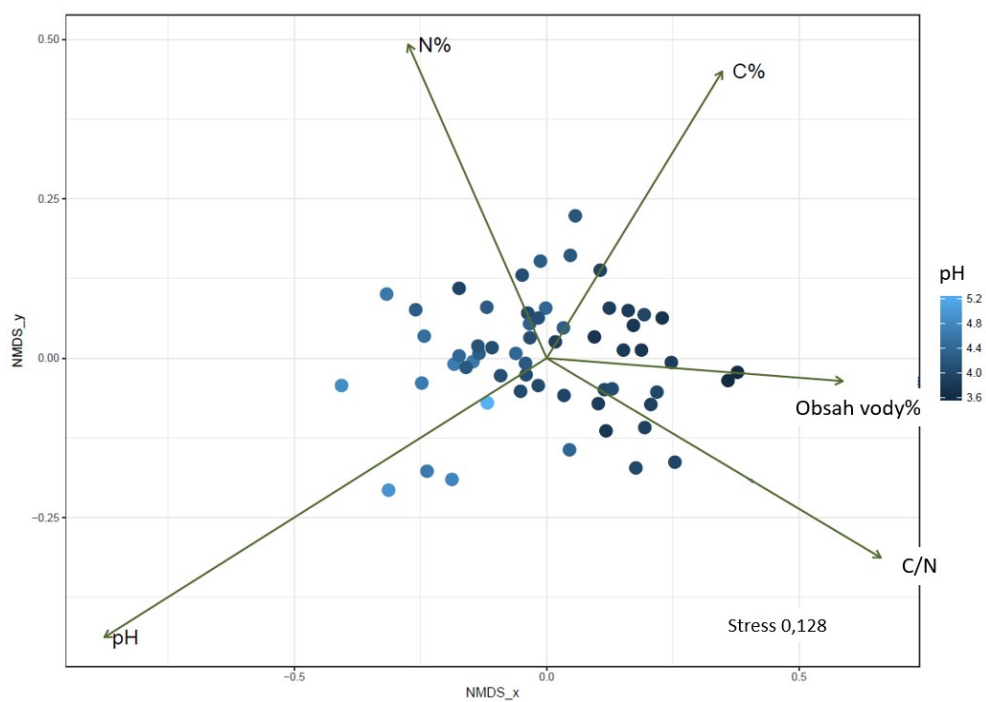


Obr. 20: Rozdíly ve složení bakteriálního společenstva v půdě, v kořenech a v opadu - zobrazení pomocí NMDS diagramu, body v diagramu ukazující složení na úrovni jedné experimentální plochy.

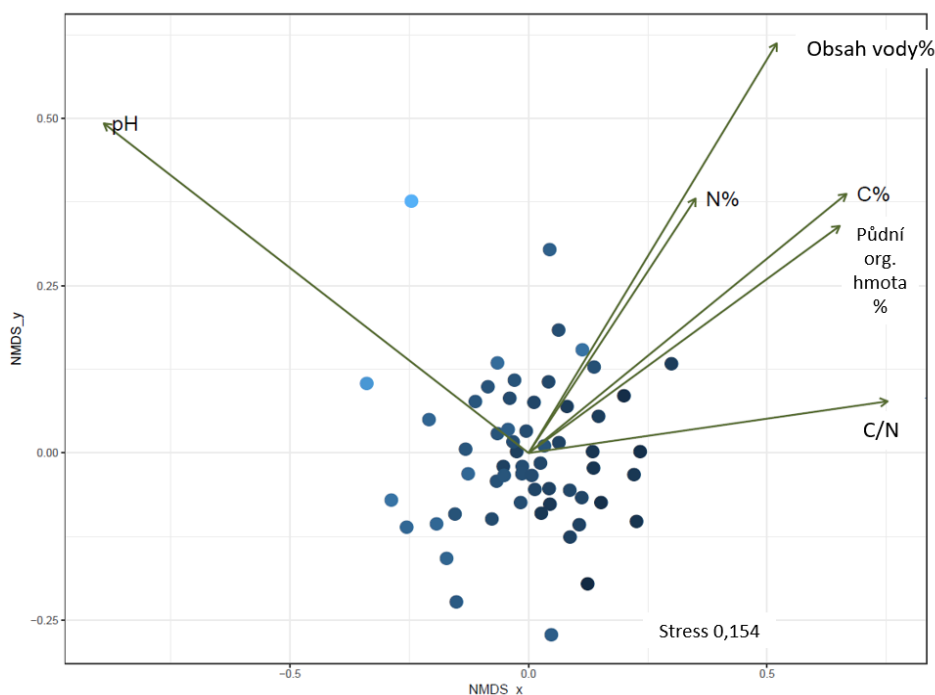
Analýza vlivu chemických parametrů na složení bakteriálního společenstva naznačila silný vliv pH ve všech třech habitatech - v půdě, v opadu i v kořenech (pro kompartment kořenů byla použita chemie půdy), Obr. 21, Obr. 22, Obr. 23, Tab. V. Pro společenstvo půdy byly dále významné obsah C i obsah vody a půdní organické hmoty. Prostorové rozmístění vektorů v opadu ukazovalo na vyšší heterogenitu v chemických vlastnostech opadu ovlivňujících složení bakteriálního společenstva, než tomu bylo v půdě a kořenech. V případě kořenů byl dalším významným faktorem obsah vody v půdě.



Obr. 21: Korelace pH a dalších chemických parametrů půdy s osami NMDS složení bakteriálního společenstva v půdě (hodnoty pH zobrazeny jako barevné odstíny).



Obr. 22: Korelace pH a dalších chemických parametrů opadu s osami NMDS složení bakteriálního společenstva v opadu (hodnoty pH zobrazeny jako barevné odstíny).



Obr. 23: Korelace pH a dalších chemických parametrů půdy s osami NMDS složení bakteriálního společenstva v kořenech (hodnoty pH půdy zobrazeny jako barevné odstíny).

Tab. V: Korelace chemických parametrů s PCA osami v jednotlivých NMDS diagramech.

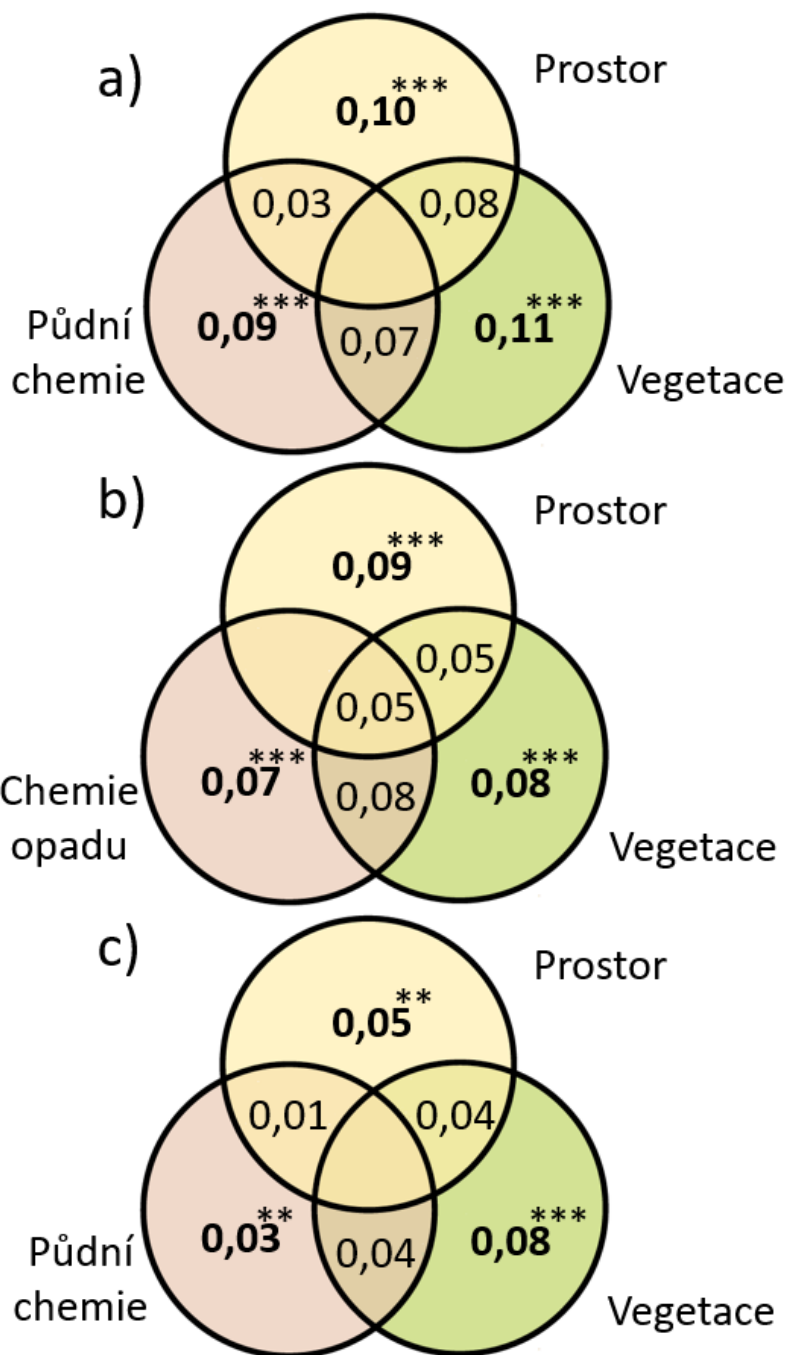
	Půdní kompartment - chemie půdy		Opadový kompartment - chemie opadu		Kořenový kompartment - chemie půdy	
	$r^2$	p hodnota	$r^2$	p hodnota	$r^2$	p hodnota
<b>pH</b>	0.8264	0.001***	0.7051	0.001***	0.7560	0.001***
<b>N%</b>	0.4410	0.001***	0.2351	0.001***	0.1925	0.001***
<b>C%</b>	0.6968	0.001***	0.2662	0.001***	0.4046	0.001***
<b>C/N</b>	0.3601	0.001***	0.3823	0.001***	0.3776	0.001***
<b>ObsahVody_puda(opad) %</b>	0.6747	0.001***	0.2635	0.001***	0.4520	0.001***
<b>Půdní organická hmota</b>	0.6373	0.001***	-	-	0.3671	0.001***

Analýza vlivu vegetace na složení společenstva bakterií byla provedena nezávisle s využitím různých vegetačních parametrů (celkové složení společenstva rostlin, složení stromového patra, složení kořenů – marker *trnL* (Tab. VI, Obr. 24). Nejlepším vysvětlujícím faktorem byly botanické snímky (tabulky přítomnosti jednotlivých druhů rostlin na studovaných lokalitách; Tab. VI). Tyto botanické snímky vysvětlovaly nejvíce variability v datech pro složení společenstev bakterií ve všech habitatech. VarPart analýza dále také odhalila účinky všech testovaných faktorů (prostor, chemie půdy a vegetace), které společně vysvětlovaly 48% variability v datech pro složení společenstva půdy (Obr. 24 a). Podobná situace byla zobrazena také v opadu, kde statisticky významnými prediktory pro složení bakteriálního společenstva byly opět všechny tři testované faktory, které dohromady

vysvětlovaly 42% variability (Obr. 24 b). Významnější čistý vliv vegetace se zdál být v kořenech (8% variability), ačkoliv půdní parametry i prostor byly také významnými prediktory pro složení bakteriálního společenstva v tomto kompartmentu (Obr. 24 c).

Tab. VI: VarPart analýza vlivu prostoru, vegetace a chemických parametrů na složení společenstva bakterií v lesních ekosystémech. Zobrazení třech různých vegetačních matic použitých jako proxy ve VarPart analýze. Hodnoty zvýrazněné tučně jsou statisticky významné \*\*\*  $p < 0,05$ , \*\*  $0,05 < p < 0,1$ .

Testované rostlinné matice		PROSTOR (x1)	VEGETACE (x2)	CHEMIE (x3)	Interakce			
					x1 + x2	x2 + x3	x1 + x3	x1 + x2 + x3
VarPart Půda	Vzorkované stromy	0,16***	0,00	0,13***	0,02	0,03	0,00	0,03
	Matice rostlinných kořenových markerů trn(L)	0,15***	0,01	0,13***	0,03	0,03	0,00	0,03
	Botanický snímek (všechny rostlinné druhy na ploše)	<b>0,10***</b>	<b>0,11***</b>	<b>0,09***</b>	0,08	0,07	0,03	0,00
VarPart Kořeny	Vzorkované stromy	0,07***	0,02*	0,05**	0,02	0,03	0,00	0,00
	Matice rostlinných kořenových markerů trn(L)	0,07***	0,04**	0,05**	0,02	0,03	0,00	0,10
	Botanický snímek (všechny rostlinné druhy na ploše)	<b>0,05**</b>	<b>0,08***</b>	<b>0,03**</b>	0,04	0,04	0,01	0,00
VarPart Opad	Vzorkované stromy	0,13***	0,03**	0,12***	0,02	0,03	0,00	0,04
	Matice rostlinných kořenových markerů trn(L)	0,13***	0,04**	0,13***	0,02	0,03	0,00	0,04
	Botanický snímek (všechny rostlinné druhy na ploše)	<b>0,09***</b>	<b>0,08***</b>	<b>0,07***</b>	0,05	0,08	0,00	0,05



Obr. 24: VarPart analýza vlivu prostoru, vegetace (botanické snímky) a chemických parametrů na složení společenstva bakterií v lesních ekosystémech. Hodnoty v grafu zvýrazněné tučně jsou statisticky významné \*\*\*  $p < 0,05$ , \*\*  $0,05 < p < 0,1$  (a – půda, b - opad, c – kořeny).

## 6 Diskuse

### 6. 1 Experiment 1 - Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lučném ekosystému

Rostlinná diverzita bývá jedním z nejčastěji testovaných prediktorů vysvětlující diverzitu bakteriálního společenstva v půdě, rhizosféře či kořenech vegetace. Studie v NPR Čertoryje prokázala pozitivní vztah mezi diverzitou rostlin a diverzitou bakterií, avšak tento vztah byl průkazný pouze v nadzemních částech rostlin. Nebyl pozorován žádný vztah mezi diverzitou rostlin a diverzitou bakterií v kořenech nebo půdě. Toto zjištění podporuje naši hypotézou o klesajícím účinku rostlinné diverzity od nadzemních částí rostlin, přes kořeny do půdy. Je také v souladu s výsledky Prober (2014) naznačující, že v lokálním měřítku rostlinná alfa diverzita pouze slabě koreluje s bakteriální diverzitou v půdě. Dále v práci Millard a Singh (2010) autoři poukazují na to, že fyzikální a chemické vlastnosti prostředí mohou významněji ovlivňovat půdní mikrobiální společenstvo a je těžké oddělit vliv vegetace od ostatních faktorů, jako je například pH. Pro rostlinná společenstva se půdní chemie zdá být důležitým prediktorem rostlinné diverzity, která typicky klesá se stoupajícím obsahem živin (Stevens *et al.*, 2004). V pozorováních nebyl zjištěn vztah mezi chemismem půdy a bakteriální diverzitou, což může být částečně způsobeno nízkou variabilitou v několika proměnných půdní chemie, v rámci malé oblasti, kterou jsme studovali.

Z taxonomického zařazení je patrné, že mezi dominantní bakteriální kmény v lučném půdě patřily kmény Proteobacteria a Actinobacteria, což potvrzují i jiné práce zabývající se lučnými ekosystémy (Kaiser *et al.*, 2016). Dále byly v půdě jako četné zaznamenány kmény Firmicutes a Verrucomicrobia. Výskyt zástupců z kmene Firmicutes je charakteristický v minerálních půdách, v případě kmene Verrucomicrobia byla zajímavá vysoká abundance rodu *Chthoniobacter*, který se pravděpodobně podílí na rozkladu organické hmoty v půdě (Lladó *et al.*, 2017). Kmen Verrucomicrobia je také potvrzen jako kmen abundantní v půdě, spekuluje se o zvyšování jeho abundance s půdní hloubkou, není ale jasné zda kvůli preferenci oligotrofního prostředí nebo kvůli osídlování specifických mikronik (Lladó *et al.*, 2017). Není překvapením, že bakteriální kmény Proteobacteria a Actinobacteria byly dominantními v kompartmentu kořenů. Nedávné studie lučných ekosystémů shrnuly, že prostředí kořenů a rhizosféra obsahuje převážně kmény Proteobacteria, Actinobacteria a Bacteroidetes (Ai *et al.*, 2015; Lundberg *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015). Jak už bylo zmíněno, mikrobiální společenstva rostlinné fylosféry vykazují vysokou variabilitu a poměrně nízkou diverzitu (Bodenhause *et al.*, 2013; Redford a



Fierer, 2009), toto odpovídá také výsledkům v kompartmentu nadzemních částí rostlin. Za povšimnutí stojí vysoce zastoupený bakteriální rod *Vibrio*. Zástupci tohoto rodu patří mezi rostlinné endofyty a bakterie podporující růst rostlin (Alagarasan *et al.*, 2017; Tariq *et al.*, 2016). Rod *Pseudomonas* byl také popsán jako hojně zastoupené endofytické bakterie u různých druhů rostlin (Vorholt, 2012).

Bylo zjištěno, že složení bakteriálních společenstev je odlišné ve všech třech studovaných habitatech, přesto bylo pozorováno určité překrytí ve sdílených bakteriálních taxonech, a to především mezi půdou a kořeny a mezi kořeny a nadzemními částmi rostlin. Vliv rostlinné diverzity na složení bakteriálních společenstev nebyl pozorován v žádném studovaném habitatu. Toto zjištění je v souladu s předchozími poznatky o travních ekosystémech (Lebeis, 2015; Sasse *et al.*, 2018) a podporuje naše předpoklady o různých zdrojích kolonizace pro nadzemní i podzemní mikrobiální společenstvo, a také o různých faktorech ovlivňujících složení společenstva. V nedávné době byla potvrzena specifická kořenových mikrobiomů vázaná na druh rostliny. Zdá se, že rostliny používají druhově specifický selektivní mechanismus při ovlivňování kořenových mikrobiomů (Dean *et al.*, 2015).

V této studii byl dále testován vliv složení vegetace, půdní chemie a prostoru na složení bakteriálního společenstva v půdě, v kořenech a v nadzemních částech rostlin. Pro nadzemní části rostlin prostor a vegetace vysvětlovaly nejvíc z pozorovatelné variability v datech, ale samostatně žádný z těchto faktorů nebyl významný. Nebyl nalezen žádný významný vliv vegetace ani v kompartmentu kořenů ani v půdě. Zajímavé jsou výsledky práce Regan (2014), kde byl mimo jiné také zkoumán vliv rostlin na složení bakteriálního společenstva v půdě travních ekosystémů. Zde byl vliv rostlin potvrzen jako významný pouze v letním období, kdy jsou rostliny nejvíce aktivní. Zatímco prostorová struktura společenstev pozitivně korelovala s fyzikálními a chemickými vlastnostmi půdy především na jaře a na podzim.

Půdní chemie byla identifikována jako faktor, průkazně ovlivňující složení bakteriálního společenstva v kořenech a v půdě. Čistý vliv půdní chemie byl významný především v kořenech. Sdílený vliv půdní chemie společně s prostorem vysvětloval 9% variability v kořenech a 35% variability v půdě. Toto je v souladu s předchozími studiemi, na jejichž základě jsme předpokládali, že některé bakterie se mohou vyskytovat v půdních mikrohabitátech, kde je možný pouze omezený vliv rostlin a tyto mikrohabitáty jsou ovlivněny spíše obsahem živin než aktivitou rostliny konkrétního druhu (Fierer, 2017; Lladó *et al.*, 2017). Prostor byl významným faktorem ovlivňujícím složení bakteriálního společenstva především v půdě. Tato skutečnost podporuje význam lokálních podmínek, které můžeme považovat za nezávislé vzhledem k pokrytí vegetací. Prostorová heterogenita půdy byla potvrzena jako další

důležitý faktor ovlivňující mikrobiální půdní společenstvo (Ritz *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009). Tato heterogenita může zahrnovat jak nestanovované chemické vlastnosti půdy, tak například vlhkost (Baldrian *et al.*, 2010b; Šnajdr *et al.*, 2013).

## **6. 2 Experiment 2 - Determinanty diverzity a složení společenstva bakterií v lesním ekosystému**

V lesních ekosystémech byl nalezen průkazný pozitivní vztah mezi diverzitou rostlin a diverzitou bakterií ve všech třech studovaných habitatech: v opadu, v půdě i v rostlinných kořenech. Toto zjištění podporuje naši hypotézu, že diverzita rostlin bude ovlivňovat diverzitu bakteriálního společenstva v opadu, v kořenech a v půdě. Přesto byl významný vliv rostlinné diverzity hlavně v habitatu půdy částečně překvapující. Podobný vztah v luční půdě nebyl pozorován, na druhou stranu vliv rostlin na složení mikrobiálních společenstev především v lesní půdě byl prokázán v několika pracích (Barberán *et al.*, 2015; Urbanová *et al.*, 2015; Gibbons *et al.*, 2017).

Lesní půdy patří mezi nejrozmanitější prostředí na Zemi, ve kterém jsou bakterie nejvíce zastoupenými mikroorganismy vůbec (Hardoim *et al.*, 2015). I přesto, že se bakteriální společenstva liší mezi jednotlivými půdními horizonty, bakteriální kmeny Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria a Bacteroidetes jsou nejvíce zastoupenými kmeny jak v organickém, tak v minerálním horizontu v lesních půdách (López-Mondéjar *et al.*, 2015). Z taxonomických analýz půdního společenstva na Šumavě je patrné, že nejvíce abundantní kmeny byly Proteobacteria, Acidobacteria a Actinobacteria. Přestože pro analýzy bylo použito pouze 10 cm svrchní půdy (převážně tedy organický horizont) a kmeny Proteobacteria a Bacteroidetes bývají nejvíce obohaceny právě v organickém horizontu (Baldrian *et al.*, 2012), jsme kmen Bacteroidetes jako abundantní v půdě nedetekovali. V nedávných studiích bylo dále potvrzeno, že Acidobacteria a Alphaproteobacteria jsou charakteristické pro kyselé půdy jehličnatých lesů (Baldrian *et al.*, 2012), což odpovídá také našim pozorováním. Několik informací navíc si zaslouží dříve opomíjený kmen Acidobacteria, jeho zástupci obývají prostředí s nejrozmanitějším obsahem uhlíku, patří mezi špatně kultivovatelné bakterie, stejně jako např. kmen Planctomycetes, přestože oba dva tyto kmeny jsou poměrně běžné v lesních půdách (Lladó *et al.*, 2017). Některé acidobakterie žijící v lesních půdách využívají uhlík z celulózy a produkují vysoké titry extracelulárních enzymů (Štursová *et al.*, 2012). Stejně jako ve studii v Národní přírodní rezervaci Čertoryje jsme zjistili, že složení bakteriálních společenstev je odlišné ve všech třech studovaných habitatech. Při porovnání habitatu půdy a opadu jsme

v opadu zaznamenali vyšší relativní zastoupení kmene Bacteroidetes a třídy Betaproteobacteria, konkrétně rodu *Burkholderia*. Bylo potvrzeno, že při rozkladu opadu hrají důležitou roli kmeny Bacteroidetes a Acidobacteria (Lladó *et al.*, 2017). V habitatu kořenů bylo zaznamenáno vyšší zastoupení kmene Proteobacteria (*Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Rhodoplanes*) a Actinobacteria a nižší zastoupení kmene Acidobacteria v porovnání s půdou a opadem. Výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi týkajícími se rhizosférického mikrobiomu, který je obohacen nejčastěji kmeny Proteobacteria (*Burkholderia*, *Rhizobium*, a *Pseudomonas*), Actinobacteria a Bacteroidetes (Lladó *et al.*, 2017; Sasse *et al.*, 2018).

Byla provedena analýza specificky se vyskytujících bakterií ve studovaných habitatech (Tabulky II, III, IV). Pro půdu byly charakteristické rody *Desulfomonile* a *Thermogemmatispora*. *Desulfomonile* je striktně anaerobní gramnegativní rod provádějící respiraci síranu (He *et al.*, 2010). *Thermogemmatispora* patří mezi sporulující grampozitivní bakteriální rod, jehož zástupci byli izolováni z geotermálních půd a také např. spadaneho listů (Yabe *et al.*, 2011). Pro opad byl charakteristický rod *Frigoribacterium* známý schopností rozkládat celulózu (Tláskal *et al.*, 2016), *Mucilaginibacter* potenciálně mykofágní bakteriální rod rozkládající také celulózu (Štursová *et al.*, 2012; Tláskal *et al.*, 2016) a *Thermosinus*, anaerobní termofilní bakterie izolované z horkých pramenů Národního parku Yellowstone (Sokolova *et al.*, 2004). Pro kořeny byly charakteristické rody *Nocardia*, *Enterococcus*, *Actinospica* a *Actinomadura*. Do rodu *Nocardia* patří jak potenciálně patogenní bakterie, tak také zástupci vyskytující se poměrně běžně v půdách s vysokým obsahem organické hmoty, v rašeliništích, v lesních půdách a rhizosféře (Golinska *et al.*, 2013; Tanasupawat *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). Informace o výskytu rodu *Enterococcus* v rhizosféře chybí, nicméně bakterie z tohoto rodu bývají součástí fekální mikroflóry, byly nalezeny v hnojených půdách a také v jezerních sedimentech (Thevenon *et al.*, 2012). *Actinospica* a *Actinomadura* jsou bakteriální rody patřící do kmene Actinobacteria, který je typický pro habitat kořenů a výše zmíněné rody patří mezi bakterie podporující růst rostlin (Suksaard *et al.*, 2017).

Při analýze vlivu prostoru, složení vegetace a chemických parametrů prostředí na složení bakteriálního společenstva byly porovnávány různé přístupy k charakterizaci vegetace s ohledem na jejich predikční schopnosti. Z testovaných matic se zdá být nejlépe popisný botanický snímek se záznamem přítomných rostlinných druhů pro všechna vegetační patra, což může naznačovat nejenom význam stromového patra, ale také význam dalších vegetačních pater – mechového, bylinného a keřového. Obecně je z literatury známo, že stromy jsou v lese nejvýznamnější živou složkou, a jako dominantní primární producenti fixují uhlík, který ve velkém množství (až 50%) alokují do půdy formou exsudátů (Baldrian, 2017; Högberg *et al.*,

2001). Některé experimentální plochy v této studii však byly heterogenní z hlediska pokryvnosti rostlin z jednotlivých vegetačních pater. Ne na všech plochách bylo dominantní stromové patro, existovaly plochy, kde bylo velmi zastoupené bylinné nebo mechové patro s minimem přítomných stromů. Na těchto plochách může být společenstvo více ovlivněno např. bylinným patrem. Matice rostlinných druhů určená na základě analyzovaných kořenových markerů *trnL* se nezdá být nejvhodnější pro charakterizaci vegetace ani v kompartmentu kořenů. Při analýzách markeru *trnL* se ukázalo, že taxonomická klasifikace nemusí být spolehlivá ani na úrovni rostlinné čeledi (Navrátilová, nepublikovaná data), respektive že taxony ze stejné čeledi mohou mít stejnou sekvenci genu. Matice založená pouze na složení stromového patra se zdá být nejméně vhodná pro charakterizaci vegetace.

Složení vegetace, chemie prostředí i faktor prostoru byly identifikovány jako srovnatelně významné faktory průkazně ovlivňující složení bakteriálního společenstva především v půdě a v opadu. Bylo prokázáno, že složení společenstva mikroorganismů v opadu i volné půdě je ovlivněno druhovou identitou stromů v lesním porostu, i když tento vliv může být nepřímý zprostředkován tím, že rostliny ovlivňují půdní chemii (Tedersoo *et al.*, 2016; Urbanová *et al.*, 2015). V habitatu kořenů byl detekován významnější vliv vegetace nežli vliv ostatních faktorů. V kořenech, především v jejich rhizosférní části, dochází k přímým interakcím s mikroorganismy. Rostliny produkují specifické exsudáty a tím selektují symbiotické mikroorganismy na svých kořenech (Augusto *et al.*, 2015; Barberán *et al.*, 2015; Gibbons *et al.*, 2017; Urbanová *et al.*, 2015). Vyšší počet rostlinných druhů má tak větší vliv na složení bakteriálního společenstva v kořenech, díky přítomnosti širšího spektra obyvatelných nik.

Pokud porovnáme výsledky v experimentu 1 a 2 je patrné, že v experimentu 1 není vidět závislost bakteriální diverzity na rostlinné diverzitě ani v kompartmentu kořenu ani v půdě, což je v kontrastu s výsledky v experimentu 2. Částečně by se toto dalo vysvětlit tím, že na louce bylo méně druhů rostlin než v lese (cca 1-40 vs. 10-70), jednalo se tedy o homogennější prostředí a to i z dalších hledisek, jako je výskyt velkých kořenů a tlejícího dřeva, proto možná není vidět závislost bakteriální diverzity na rostlinné diverzitě v lučním ekosystému. Lesní vzorky byly také z podstatně větší plochy a zahrnovaly podstatně větší rozsah variability chemického složení půdy a klimatu (výškový gradient). Dalším důležitým aspektem může být výskyt arbuskulární mykorhizy v lučním ekosystému, která bývá sdílená mezi různými druhy rostlin (Hiiesalu *et al.*, 2014). Toto mutualistické soužití mezi arbuskulární mykorhizou a různými rostlinami nevede tedy k vyšší diverzitě mikroorganismů v kořenech a půdě. Kontrastní situace může být pozorována v lesním ekosystému, kde jsou stromy často ve vztahu

s ektomykorhizními houbami a tyto vztahy bývají druhově specifické (Tedersoo *et al.*, 2008). Vyšší druhová variabilita ektomykorhizních hub může vést k vyšší diverzitě bakterií navázaných přes zdroj živin na tuto mykorhizu, protože s jednotlivými mykorhizními houbami mohou asociovat specifická společenstva bakterií (Kluber *et al.*, 2011). V neposlední řadě v případě lesa se z pohledu mikroskopických minimálně pohyblivých bakterií může jednat o rozdíly mezi vzorky odpovídající úrovni beta-diverzity, kde bude vliv na bakteriální společenstva možná markantnější.

## 7 Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá vztahy mezi diverzitou vegetace a diverzitou bakteriálních společenstev v lučním a lesním ekosystému, dále zkoumá faktory, které mohou ovlivňovat složení společenstva bakterií v těchto ekosystémech.

V experimentu 1, který se zabýval složením společenstva bakterií v lučním ekosystému, bylo potvrzeno, že rostlinná diverzita má vliv na diverzitu bakteriálního společenstva v nadzemních částech rostlin. V kořenech a v půdě tento vliv nebyl detekován. Jako faktory ovlivňující složení bakteriálního společenstva v nadzemních částech rostlin byly identifikovány prostor a vegetace. Pro habitat kořenů byly významné hlavně parametry půdy, pro habitat půdy byly významné jak prostor, tak půdní parametry.

V experimentu 2, který se zabýval složením společenstva bakterií v lesním ekosystému, byl detekován vliv diverzity vegetace na diverzitu bakteriálního společenstva ve všech studovaných habitatech - v opadu, v kořenech i v půdě. Při studiu složení společenstva bakterií ve všech třech habitatech se ukázaly významné jak složení vegetace, tak i chemické parametry prostředí a faktor prostoru. Složení vegetace se zdá být nejsilnějším faktorem ovlivňujícím složení bakteriálního společenstva v kořenech.

To, že v lučním ekosystému nebyla nalezena závislost mezi bakteriální diverzitou a rostlinnou diverzitou ani v kompartmentu kořenu ani v půdě, může být vysvětleno výskytem arbuskulární mykorrhizy, která bývá sdílená mezi různými druhy rostlin (Hiiesalu *et al.*, 2014) a obecně tento ekosystém můžeme považovat za více homogenní prostředí ve srovnání s heterogenním prostředím lesa. V lesním ekosystému, kde jsou stromy často ve vztahu s ektomykorrhizními houbami a tyto vztahy bývají druhově specifické (Tedersoo *et al.*, 2008), může vést vyšší druhová variabilita ektomykorrhizních hub k vyšší diverzitě bakterií.

Oba dva experimenty byly unikátní z několika hledisek – pokrývaly poměrně rozsáhlé oblasti a pro analýzy bylo použito velké množství vzorků. Dále proběhly důkladné analýzy chemie prostředí a podrobný popis vegetace, nicméně pro zobecnění závěrů by bylo třeba více experimentů jak v ekosystému lesa, tak v lučním ekosystému.

## 8 Doplnkové tabulky

Doplnková tabulka I: Geografická a environmentální data vztahující se k lokalitám v NPR Čertoryje

Plocha	Zeměpisná délka	Zeměpisná šířka	Ca (ppm)	Mg (ppm)	K (ppm)	P (ppm)	C (%)	N (%)	C/N	C/P	N/P	Půdní organická hmota (%)	pH	Kořenová biomasa (kg/m <sup>2</sup> )	Počet druhů rostlin (rostlinná diverzita)
1	17°24'30.3" E	48°51'26.6" N	4168	374	218	2	3,5	0,5	7,8	17700,0	2280,0	10,5	6,7	0,6	35
2	17°24'29.5" E	48°51'26.1" N	5047	469	252	4,2	7,8	0,7	11,0	18523,8	1685,7	16,8	6,4	2,7	27
3	17°24'31.5" E	48°51'28.3" N	7417	380	325	2,1	5,0	0,6	7,8	23761,9	3028,6	15,0	6,8	1,1	6
4	17°24'31.7" E	48°51'29.1" N	6690	588	354	3,9	6,0	0,8	7,8	15282,1	1969,2	16,6	6,7	1,0	19
5	17°24'32.4" E	48°51'31.1" N	10941	695	358	5,3	7,2	0,9	8,4	13660,4	1630,2	19,7	6,8	2,8	22
6	17°24'31.5" E	48°51'32.5" N	7780	720	397	7,6	7,7	0,9	9,0	10184,2	1136,8	21,5	6,5	2,3	17
7	17°24'41.3" E	48°51'30.9" N	4031	364	297	2	5,7	0,6	8,9	28500,0	3205,0	16,0	5,9	1,6	43
8	17°24'50.1" E	48°51'30.2" N	8549	627	366	3	8,4	0,9	9,3	28100,0	3016,7	23,0	6,6	1,6	32
9	17°24'12.9" E	48°51'28.8" N	4681	425	219	4,1	6,9	0,8	9,0	16804,9	1858,5	17,9	5,8	2,5	18
10	17°25'14.0" E	48°51'28.5" N	5656	476	363	3,3	7,2	0,8	9,4	21878,8	2321,2	19,3	5,9	1,9	13
11	17°25'12.4" E	48°51'26.9" N	2682	218	157	3	4,9	0,6	7,7	16266,7	2120,0	14,3	5,7	1,5	18
12	17°25'12.5" E	48°51'26.4" N	5010	209	191	11,2	4,5	0,7	6,6	3982,1	600,0	12,8	6,2	1,0	6
13	17°25'04.9" E	48°51'26.3" N	4795	418	269	3,7	6,3	0,8	8,0	16891,9	2116,2	18,1	5,9	4,1	22
14	17°25'04.3" E	48°51'23.2" N	2691	213	160	3,1	5,5	0,8	7,2	17677,4	2441,9	15,4	5,4	4,3	11
15	17°25'02.7" E	48°51'21.8" N	2000	166	258	6,9	5,5	0,6	8,9	8000,0	902,9	14,8	5,4	1,8	1
16	17°25'01.0" E	48°51'21.1" N	2341	218	276	12,4	4,3	0,6	7,2	3435,5	476,6	12,2	5,7	1,6	12
17	17°24'40.1" E	48°51'18.6" N	4780	438	308	6,2	5,8	0,7	8,3	9403,2	1138,7	16,5	6,4	0,8	6
18	17°24'18.7" E	48°51'35.3" N	3336	284	198	2	4,0	0,6	6,7	20050,0	3015,0	11,5	5,9	0,8	25
19	17°24'19.6" E	48°51'35.8" N	4116	385	254	2,1	4,8	0,7	7,2	22809,5	3166,7	13,7	5,9	2,2	10
20	17°24'17.9" E	48°51'35.0" N	2819	310	294	5,5	4,4	0,6	7,0	7981,8	1138,2	12,4	6,3	0,4	32
21	17°24'50.7" E	48°51'32.7" N	4862	334	283	3,8	7,1	0,8	8,5	18789,5	2213,2	18,8	5,9	3,0	39
22	17°24'50.6" E	48°51'32.9" N	5469	270	448	3,3	4,7	0,7	6,7	14181,8	2112,1	13,8	6,6	1,3	3
23	17°24'51.0" E	48°51'33.1" N	4186	326	493	3,5	4,6	0,6	7,4	13171,4	1774,3	13,3	6,1	0,4	11
24	17°24'51.2" E	48°51'32.3" N	6453	520	274	4	6,9	0,9	8,1	17250,0	2130,0	19,0	6,1	3,4	36
25	17°24'42.7" E	48°51'30.1" N	6247	574	603	20,2	9,0	0,9	10,1	4435,6	438,1	22,0	6,5	1,6	3

Doplňková tabulka II: Geografická a environmentální data vztahující se k experimentálním plochám v NP Šumava

PLOCHA	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	PŮDA						OPAD				
			pH	N%	C%	C/N	Obsah vody%	Půdní organická hmota %	pH	N%	C%	C/N	Obsah vody%
TS1	49°7'7.4443"N	13°15'1.5712"E	4,3	0,5	9,4	20,5	26,7	23,8	4,6	1,8	44,0	24,6	42,0
TS2	49°7'17.7785"N	13°15'41.0045"E	4,3	0,3	5,4	19,8	23,6	16,8	4,7	1,0	31,5	30,6	47,6
TS3	49°7'10.6247"N	13°15'54.4301"E	4,0	0,4	8,7	24,9	21,7	17,8	4,1	1,4	34,3	24,8	44,1
TS4	49°7'19.3375"N	13°16'6.5238"E	4,0	0,3	6,7	23,8	26,8	17,9	4,0	1,7	40,1	23,8	44,8
TS5	49°7'38.2386"N	13°16'25.3089"E	3,8	0,8	17,7	23,5	39,2	37,0	4,0	1,7	42,4	25,1	60,9
TS7	49°9'26.6082"N	13°19'31.1905"E	4,2	1,2	26,6	21,5	72,7	48,1	4,0	1,2	38,9	32,0	64,7
TS8	49°9'11.4419"N	13°19'58.6274"E	4,0	1,5	37,4	25,3	70,9	64,8	3,9	1,1	43,6	39,9	55,0
TS9	49°9'48.4515"N	13°20'16.1761"E	4,0	0,8	20,1	24,9	54,8	39,8	4,0	1,2	43,7	37,7	55,5
TS10	49°9'37.2601"N	13°21'9.0025"E	5,2	1,1	20,7	18,2	65,9	42,9	4,8	1,3	38,6	28,6	50,9
TS11	49°8'44.5676"N	13°22'0.1584"E	4,0	0,7	18,4	26,4	50,9	36,4	4,1	1,2	36,8	31,9	39,9
TS12	49°9'3.3210"N	13°22'48.2687"E	4,0	1,1	25,3	23,0	54,6	59,6	3,9	1,4	41,8	29,0	44,6
TS13	49°5'51.3360"N	13°24'31.2177"E	4,1	1,6	38,5	24,4	81,0	92,2	4,0	1,4	45,1	31,9	78,0
TS14	49°6'16.7836"N	13°26'27.7530"E	3,9	0,3	9,9	31,4	23,8	28,1	3,9	1,0	46,2	44,8	46,0
TS15	49°5'32.6751"N	13°29'32.6350"E	3,7	0,6	18,2	28,2	60,5	47,8	3,6	1,5	44,9	30,9	72,1
TS16	49°5'27.0482"N	13°29'49.9200"E	3,8	0,5	11,3	25,0	37,8	22,0	3,8	1,3	43,9	33,4	62,4
TS17	49°5'2.5152"N	13°29'39.1341"E	3,8	0,3	8,8	25,6	38,0	31,0	3,8	1,0	39,6	39,1	68,4
TS18	49°4'37.1916"N	13°30'22.3908"E	3,8	0,4	11,7	27,9	28,1	34,3	3,8	1,0	36,2	36,9	41,9
TS19	49°3'19.6525"N	13°23'53.2601"E	4,0	0,2	4,6	21,9	30,5	16,9	4,2	1,7	41,2	23,8	54,6
TS20	49°2'11.6251"N	13°24'43.9457"E	3,7	0,5	12,1	26,0	49,2	25,1	4,0	1,5	41,9	27,3	73,4
TS21	49°1'57.1117"N	13°26'15.8809"E	4,0	0,6	9,8	15,8	42,7	33,5	4,0	1,6	32,6	20,2	59,3
TS23	49°1'21.6501"N	13°25'58.0641"E	3,7	0,8	15,1	18,7	35,4	32,4	3,9	1,7	44,9	26,6	56,9
TS24	49°1'25.1935"N	13°27'50.6069"E	4,0	0,6	10,9	17,2	50,3	35,3	4,3	2,0	42,8	21,7	74,8
TS25	49°0'45.3091"N	13°26'45.3994"E	4,4	1,4	28,3	20,1	67,8	66,1	4,3	1,6	47,3	29,5	76,0
TS26	49°0'23.2053"N	13°25'33.3778"E	3,7	1,5	46,7	31,5	82,4	95,2	4,0	1,3	44,8	35,1	85,0
TS27	48°59'10.2835"N	13°24'33.6739"E	4,0	1,7	25,4	15,4	70,5	67,0	4,4	1,5	45,1	29,1	78,2
TS28	49°0'17.7216"N	13°27'16.3873"E	4,1	2,9	36,0	12,3	47,2	78,3	5,3	1,9	43,7	23,0	62,5
TS29	48°59'45.8497"N	13°26'20.4350"E	3,8	0,5	9,3	18,2	40,8	27,3	4,3	2,0	44,5	22,6	70,5
TS30	48°59'29.5479"N	13°26'25.0855"E	3,9	0,8	17,7	21,1	59,7	42,4	4,3	1,9	43,7	22,6	71,7
TS31	48°59'20.5870"N	13°26'13.9957"E	3,9	0,8	14,6	17,7	56,4	45,0	4,2	2,0	42,5	21,6	69,9
TS32	49°0'16.9272"N	13°29'47.4171"E	3,6	1,1	25,1	22,8	56,3	61,3	3,9	1,4	45,9	32,6	65,0
TS33	48°58'37.1386"N	13°27'13.2890"E	3,9	0,5	9,0	16,6	52,9	32,2	4,4	1,6	43,8	27,2	76,3
TS34	48°57'59.4495"N	13°29'1.7164"E	4,3	1,2	20,2	17,6	67,7	62,5	4,4	1,3	42,8	33,9	87,4
TS35	48°58'6.3339"N	13°30'15.0377"E	3,8	0,9	15,2	16,6	52,0	43,0	4,1	1,9	43,4	23,3	69,8
TS36	49°2'13.5124"N	13°33'28.7456"E	3,6	0,4	8,7	19,8	40,9	27,0	3,8	1,3	43,8	32,8	74,3
TS37	49°0'53.7929"N	13°33'22.8111"E	3,9	0,6	10,7	16,8	39,9	24,6	4,1	1,5	43,6	28,2	58,0
TS38	48°56'36.4817"N	13°38'41.1453"E	3,5	1,1	20,9	18,9	30,4	44,1	4,0	1,5	42,1	27,6	40,8
TS39	48°56'21.7182"N	13°38'43.0344"E	3,5	1,3	36,5	29,0	80,1	96,6	3,9	1,5	46,4	31,7	82,5
TS40	48°55'30.2390"N	13°38'28.6081"E	4,3	0,5	7,8	15,8	22,8	21,6	4,5	1,6	42,2	26,3	37,4
TS41	48°55'9.7032"N	13°40'15.7269"E	3,9	1,6	29,4	18,7	59,6	69,9	4,3	1,5	41,7	28,0	51,0
TS42	48°53'51.1651"N	13°39'30.9970"E	3,7	1,3	30,6	23,9	69,6	69,4	4,0	1,2	44,7	38,1	88,5
TS43	48°53'52.6047"N	13°42'47.3580"E	4,3	0,4	5,8	15,9	38,3	22,2	4,6	1,4	40,7	28,8	42,5
TS44	48°53'50.1074"N	13°43'52.4001"E	3,7	1,5	46,7	30,4	86,4	96,0	3,9	1,0	45,7	44,9	87,6
TS45	48°54'5.9040"N	13°48'5.4198"E	4,1	0,6	8,9	16,2	41,0	31,1	4,9	1,6	38,8	24,8	61,3
TS46	48°51'33.3211"N	13°53'48.4432"E	4,4	0,8	13,3	17,5	42,5	32,1	4,7	1,3	31,6	23,7	49,0
TS47	48°48'47.9908"N	13°56'27.9562"E	4,2	0,8	14,7	19,4	43,8	35,1	3,8	1,5	44,1	29,3	56,2
TS48	48°48'33.4401"N	13°56'36.5760"E	3,6	1,6	46,1	28,0	82,8	96,6	3,6	1,2	46,7	38,8	81,7
TS50	48°45'43.9739"N	13°53'4.6255"E	4,2	0,3	6,5	20,5	31,3	13,8	4,1	1,8	43,7	23,8	67,6
TS51	48°45'31.4831"N	13°53'54.7059"E	3,8	1,2	19,4	15,7	49,7	40,8	4,1	1,7	46,2	26,4	64,6
TS52	48°45'25.1921"N	13°54'8.3248"E	4,0	0,7	11,9	17,3	49,0	24,5	4,3	1,8	45,0	25,2	71,5
TS53	48°45'21.7053"N	13°54'47.1045"E	3,9	0,6	10,2	18,0	40,1	23,4	4,4	1,7	43,2	25,1	66,5
TS54	48°45'28.7222"N	13°55'55.9911"E	4,9	0,4	5,5	14,4	38,3	14,0	5,0	1,0	26,0	24,8	47,5
TS55	48°45'7.4529"N	13°55'13.6105"E	4,3	1,2	18,8	16,3	64,2	50,2	4,7	1,5	45,0	29,8	64,6
TS56	48°44'52.0917"N	13°55'21.0026"E	3,9	1,1	16,9	16,0	47,9	36,2	4,1	1,9	45,4	23,6	64,8
TS57	48°45'3.2349"N	13°55'52.4480"E	3,9	1,0	15,4	16,2	40,4	39,1	4,2	2,0	43,8	21,5	59,9
TS58	48°44'56.8418"N	13°56'5.2586"E	4,1	0,6	10,6	16,4	38,4	30,2	4,2	1,9	45,9	24,7	59,4
TS59	48°44'15.6925"N	13°56'4.4905"E	4,1	0,6	11,9	21,5	46,1	27,8	4,3	1,4	44,9	31,0	59,0
TS60	48°44'18.8755"N	13°56'30.3981"E	3,6	1,9	45,0	23,2	77,8	95,8	3,7	1,4	46,0	33,8	82,1
TS61	49°2'45.5"N	13°37'3.6"E	3,7	0,5	10,8	20,7	46,9	33,5	3,9	1,7	44,2	26,4	72,6



## 9 Seznam použité literatury

- Ai C, Liang G, Sun J, Wang X, He P, Zhou W, *et al.* (2015). Reduced dependence of rhizosphere microbiome on plant-derived carbon in 32-year long-term inorganic and organic fertilized soils. *Soil Biol Biochem* **80**: 70–78.
- Alagarasan G, Aswathy KS, Madhaiyan M. (2017). Shoot the message , not the messenger — combating pathogenic virulence in plants by inhibiting quorum sensing mediated signaling molecules. *Front Plant Sci* **8**: 1–9.
- Aronesty E. (2013). Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinforma J* **7**: 1–8.
- Augusto L, De Schrijver A, Vesterdal L, Smolander A, Prescott C, Ranger J. (2015). Influences of evergreen gymnosperm and deciduous angiosperm tree species on the functioning of temperate and boreal forests. *Biol Rev* **90**: 444–466.
- Badri D V, Vivanco JM. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant , Cell Environ* **29**: 666–681.
- Baetz U, Martinoia E. (2014). Root exudates : the hidden part of plant defense. *Trends Plant Sci* **19**: 90–98.
- Bagchi R, Gallery RE, Gripenberg S, Gurr SJ, Narayan L, Addis CE, *et al.* (2014). Pathogens and insect herbivores drive rainforest plant diversity and composition. *Nature* **506**: 85–88.
- Bahram M, Kohout P, Anslan S, Harend H, Abarenkov K, Tedersoo L. (2016). Stochastic distribution of small soil eukaryotes resulting from high dispersal and drift in a local environment. *ISME J* **10**: 885–896.
- Baldrian P. (2017). Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiol Rev* **41**: 109–130.
- Baldrian P, Kolářík M, Štursová M, Kopecký J, Valášková V, Větrovský T, *et al.* (2012). Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* **6**: 248–258.
- Baldrian P, Merhautová V, Cajthaml T, Petránková M, Šnajdr J. (2010a). Small-scale distribution of extracellular enzymes, fungal, and bacterial biomass in *Quercus petraea* forest topsoil. *Biol Fertil Soils* **46**: 717–726.
- Baldrian P, Merhautová V, Petránková M, Šnajdr J. (2010b). Distribution of microbial biomass and activity of extracellular enzymes in a hardwood forest soil reflect soil moisture content. *Appl Soil Ecol* **46**: 177–182.
- Banasiak J, Biała W, Staszków A, Swarczewicz B, Ewa K. (2018). A *Medicago*

- truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. *J Exp Bot* **64**: 1005–1015.
- Barberán A, Mcguire KL, Wolf JA, Jones FA, Wright SJ, Turner BL, *et al.* (2015). Relating belowground microbial composition to the taxonomic, phylogenetic, and functional trait distributions of trees in a tropical forest. *Ecol Lett* **18**: 1397–1405.
- Bardgett R, Mawdsley J, Edwards S, Hobbs P, Rodwell J, Davies W. (1999). Plant species and nitrogen effects on soil biological properties of temperate upland grasslands. *Funct Ecol* **13**: 650–660.
- Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A. (1996). Changes in soil fungal : bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fertil Soils* **22**: 261–264.
- Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1621–1630.
- Besnard J, Pratelli R, Zhao C, Sonawala U, Collakova E. (2018). UMAMIT14 is an amino acid exporter involved in phloem unloading in *Arabidopsis* roots. *Am J Bot* **67**: 6385–6397.
- Bodenhause N, Horton MW, Bergelson J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana* . *PLoS One* **8**: e56329.
- Borcard D, Legendre P. (2002). All-scale spatial analysis of ecological data by means of principal coordinates of neighbour matrices. *Ecol Modell* **153**: 51–68.
- Brabcová V, Nováková M, Davidová A, Baldrian P. (2016). Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytol* **210**: 1369–1381.
- Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol* **74**: 738–744.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, McHardy AC, Schulze-Lefert P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe* **17**: 392–403.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver E, Themaat L Van, Ahmadinejad N, *et al.* (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**: 91–95.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants.

*Annu Rev Plant Biol* **64**: 807–838.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, *et al.* (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 4516–4522.

Carrell AA, Frank AC. (2015). Bacterial endophyte communities in the foliage of coast redwood and giant sequoia. *Front Microbiol* **6**: 1–11.

Carvalhais LC, Dennis PG, Fan B, Fedoseyenko D, Kierul K, Becker A, *et al.* (2013). Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLoS One* **8**: e68555.

Chaparro JM, Badri D V, Vivanco JM. (2013). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J* **8**: 790–803.

Chytrý M, Dražil T, Hájek M, Kalníková V, Preislerová Z, Šibík J, *et al.* (2015). The most species-rich plant communities in the Czech Republic and Slovakia ( with new world records ). *PRESLIA* **87**: 217–278.

Crowther TW, Glick HB, Covey KR, Bettigole C, Maynard DS, Thomas SM, *et al.* (2015). Mapping tree density at a global scale. *Nature* **525**: 201–205.

Dean SL, Farrer EC, Porras-Alfaro A, Suding KN, Sinsabaugh RL. (2015). Assembly of root-associated bacteria communities: Interactions between abiotic and biotic factors. *Environ Microbiol Rep* **7**: 102–110.

Edgar RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460–2461.

Edgar RC. (2013). UPARSE : highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods* **10**: 996–998.

Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E911–E920.

Eisenhauer N, Dobies T, Cesarz S, Hobbie SE, Meyer RJ, Worm K. (2013). Plant diversity effects on soil food webs are stronger than those of elevated CO<sub>2</sub> and N deposition in a long-term grassland experiment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 6889–6894.

Eisenhauer N, Lanoue A, Strecker T, Scheu S, Steinauer K, Thakur MP, *et al.* (2017). Root biomass and exudates link plant diversity with soil bacterial and fungal biomass. *Sci Rep* **7**: 1–8.

Essarioui A, Kistler HC, Kinkel LL. (2016). Nutrient use preferences among soil *Streptomyces* suggest greater resource competition in monoculture than polyculture plant communities. *Plant Soil* **409**: 329–343.

- Essarioui A, Leblanc N, Kistler HC, Kinkel LL. (2017). Plant community richness mediates inhibitory interactions and resource competition between *Streptomyces* and *Fusarium* populations in the rhizosphere. *Microb Ecol* **74**: 157–167.
- Fierer N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* **103**: 626–631.
- Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354–1364.
- Fierer N, Jackson RB. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 626–631.
- Gibbons SM, Lekberg Y, Mummey DL, Sangwan N, Ramsey PW, Gilbert JA. (2017). Invasive plants rapidly reshape soil properties in a grassland ecosystem. *mSystems* **2**: 1–13.
- Golinska P, Wang D, Goodfellow M. (2013). *Nocardia aciditolerans* sp . nov ., isolated from a spruce forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* **103**: 1079–1088.
- Gömöryová E. (2004). Small-scale variation of microbial activities in a forest soil under a beech (*Fagus sylvatica*) stand. *Polish J Ecol* **52**: 311–321.
- Grayston SJ, Campbell CD, Bardgett RD, Mawdsley JL, Clegg CD, Ritz K, *et al.* (2004). Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. *Appl Soil Ecol* **25**: 63–84.
- Grayston SJ, Grif GS, Mawdsley JL, Campbell CD, Bardgett RD. (2001). Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem* **33**: 533–551.
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* **30**: 369–378.
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä M, Compant S, Campisano A, *et al.* (2015). The hidden world within plants : Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 293–320.
- He J-Z, Liu X-Z, Zheng Y, Zhang L-M. (2010). Dynamics of sulfate reduction and sulfate-reducing prokaryotes in anaerobic paddy soil amended with rice straw. *Biol Fertil Soils* **46**: 283–291.
- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* **11**: 296–310.

- Hiiesalu I, Pärtel M, Davison J, Gerhold P, Metsis M, Moora M, *et al.* (2014). Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi: Associations with grassland plant richness and biomass. *New Phytol* **203**: 233–244.
- Högberg P, Nordgren A, Buchmann N, Taylor A, Ekblad A, Högberg M, *et al.* (2001). Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* **411**: 789–792.
- Innes L, Hobbs PJ, Bardgett RD. (2004). The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility. *Biol Fertil Soils* **40**: 7–13.
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* **321**: 5–33.
- Jongepierová I. (2008). Grasslands of the White Carpathian Mountains. ZO ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou.
- Kaiser K, Wemheuer B, Korolkow V, Wemheuer F, Nacke H, Schöning I, *et al.* (2016). Driving forces of soil bacterial community structure , diversity , and function in temperate grasslands and forests. *Sci Rep* **6**: 1–12.
- Kluber LA, Smith JE, Myrold DD. (2011). Distinctive fungal and bacterial communities are associated with mats formed by ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* **43**: 1042–1050.
- Kolb S. (2009). The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils. *Environ Microbiol Rep* **1**: 336–346.
- Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, *et al.* (2012). A petunia ABC protein controls strigolactone- dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* **483**: 3–8.
- Kuzyakov Y, Blagodatskaya E. (2015). Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biol Biochem* **83**: 184–199.
- Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW. (2016). Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome* **4**: 1–10.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol Biochem* **40**: 2407–2415.
- Lebeis SL. (2015). Greater than the sum of their parts: Characterizing plant microbiomes at the community-level. *Curr Opin Plant Biol* **24**: 82–86.
- Lladó S, López-Mondéjar R, Baldrian P. (2017). Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiol Mol Biol Rev* **81**: e00063-16.

- López-Mondéjar R, Voříšková J, Větrovský T, Baldrian P. (2015). The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biol Biochem* **87**: 43–50.
- Lundberg D, Lebeis S, Paredes S, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, *et al.* (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**: 86–90.
- Madsen LH, Jurkiewicz A, Sullivan JT, Heckmann AB, Bek AS, Ronson CW, *et al.* (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* **1**: 1–12.
- Malhi Y, Baldocchi DD, Jarvis PG, Management R, Turbulence A, Division D, *et al.* (1999). The carbon balance of tropical, temperate and boreal forests. *Environment* **22**: 715–740.
- Marilley L, Vogt G, Blanc M, Aragno M. (1998). Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. *Plant Soil* **198**: 219–224.
- Massalha H, Korenblum E, Malitsky S, Shapiro OH, Aharoni A. (2017). Live imaging of root – bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 4549–4554.
- McElroy MS, Papadopoulos YA, Adl MS. (2012). Complexity and composition of pasture swards affect plant productivity and soil organisms. *Can J Plant Sci* **92**: 687–697.
- Meadow JF, Zabinski CA. (2012). Linking symbiont community structures in a model arbuscular mycorrhizal system. *New Phytol* **194**: 800–809.
- Milcu A, Allan E, Roscher C, Jenkins T, Meyer ST, Flynn D, *et al.* (2013). Functionally and phylogenetically diverse plant communities key to soil biota. *Ecology* **94**: 1878–1885.
- Millard P, Singh BK. (2010). Does grassland vegetation drive soil microbial diversity? *Nutr Cycl Agroecosystems* **88**: 147–158.
- Moe LA. (2013). Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *Am J Bot* **100**: 1692–1705.
- Mönchgesang S, Strehmel N, Schmidt S, Westphal L, Taruttis F, Muller E, *et al.* (2016). Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana* -linking metabolomic and genomic data. *Sci Rep* **6**: 1–11.
- Mooshammer M, Wanek W, Hammerle I, Fuchslueger L, Hofhansl F, Knoltsch A, *et al.* (2014). Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nat Commun* **5**: 1–7.
- Muller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. (2016). The plant microbiota : systems-

level insights and perspectives. *Annu Rev Genet* **50**: 1–24.

Nunan N, Daniell TJ, Singh BK, Papert A, McNicol JW, Prosser JI. (2005). Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6784–6792.

Oksanen J, Blanchet F, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, *et al.* (2015). *vegan*: Community Ecology Package. Version 2.4-2. [WWW document] URL <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> [accessed 21 January 2017].

Panke-Buisse K, Lee S, Kao-Kniffin J. (2017). Cultivated sub-populations of soil microbiomes retain early flowering plant trait. *Microb Ecol* **73**: 394–403.

Paterson E, Gebbing T, Abel C, Sim A, Telfer G, Paterson E. (2007). Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytol* **173**: 600–610.

Peay KG, Baraloto C, Fine PVA. (2013). Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *ISME J* **7**: 1852–1861.

Peh KS, Corlett RT, Bergeron Y. (2015). *Routledge handbook of forest ecology*. Routledge Handbooks.

Peñuelas J, Rico L, Ogaya R, Jump AS, Terradas J. (2012). Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed mediterranean forest. *Plant Biol* **14**: 565–575.

Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, Borcard D. (2006). Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology* **87**: 2614–2625.

Perry DA, Oren R, Hart SC. (2008). *Forest ecosystems*. JHU press.

Prescott CE, Grayston SJ. (2013). Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *For Ecol Manage* **309**: 19–27.

Prober SM, Leff JW, Bates ST, Borer ET, Firn J, Harpole WS, *et al.* (2014). Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecol Lett* **18**: 85–95.

R Core Team R. (2016). *R: a language and environment for statistical computing*. Version 3.3.1. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N. (2010). The ecology of the phyllosphere: Geographic and phylogenetic variability in the distribution of

- bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* **12**: 2885–2893.
- Redford AJ, Fierer N. (2009). Bacterial succession on the leaf surface: A novel system for studying successional dynamics. *Microb Ecol* **58**: 189–198.
- Regan KM, Nunan N, Boeddinghaus RS, Baumgartner V, Berner D, Boch S, *et al.* (2014). Seasonal controls on grassland microbial biogeography: Are they governed by plants, abiotic properties or both? *Soil Biol Biochem* **71**: 21–30.
- Ridgway KP, Duck JM, Young JPW. (2003). Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trn L (UAA) intron. *BMC Ecol* **3:8**: 6–11.
- Ritz K, McNicol JW, Nunan N, Grayston S, Millard P, Atkinson D. (2004). Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in an upland grassland. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 191–205.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, *et al.* (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* **4**: 1340–1351.
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Pare PW. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial. *Plant Physiol* **148**: 1547–1556.
- Saetre P. (1999). Spatial patterns of ground vegetation, soil microbial biomass and activity in a mixed spruce-birch stand. *Ecography (Cop)* **22**: 183–192.
- Saetre P, Bååth E. (2000). Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand. *Soil Biol Biochem* **32**: 909–917.
- Sagova-Mareckova M, Cermak L, Novotna J, Plhackova K, Forstova J, Kopecky J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2902–2907.
- Šamonil P, Král K, Hort L. (2010). The role of tree uprooting in soil formation: A critical literature review. *Geoderma* **157**: 65–79.
- Šamonil P, Valtera M, Bek S, Šebková B, Vrška T, Houška J. (2011). Soil variability through spatial scales in a permanently disturbed natural spruce-fir-beech forest. *Eur J For Res* **130**: 1075–1091.
- Sasse J, Martinoia E, Northen T. (2018). Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci* **23**: 25–41.
- Schaetzl RJ, Burns SF, Johnson DL, Small TW. (1988). Tree uprooting: review of impacts on forest ecology. *Plant Ecol* **79**: 165–176.
- Schlaeppli K, Dombrowski N, Garrido R, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. (2014). Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in



- Arabidopsis thaliana relatives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 589–592.
- Schlatter DC, Bakker MG, Bradeen JM, Kinkel LL. (2015). Plant community richness and microbial interactions structure bacterial communities in soil. *Ecology* **96**: 134–142.
- Schreiter S, Ding G-C, Holger H, Neumann G, Sandmann M, Grosch R, *et al.* (2014). Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front Microbiol* **5**: 1–13.
- Sharma S, Kulkarni J, Jha B. (2016). Halotolerant *Rhizobacteria* promote growth and enhance salinity tolerance in peanut isolation of bacterial isolates. *Front Microbiol* **7**: 1–11.
- Shi S, Nuccio E, Herman DJ, Rijkers R, Estera K, Jiabao L. (2015). Successional trajectories of rhizosphere bacterial communities over consecutive seasons. *MBio* **6**: 13–20.
- Singh BK, Dawson LA, Macdonald CA, Buckland SM. (2009). Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Appl Soil Ecol* **41**: 239–248.
- Singh BK, Munro S, Potts JM, Millard P. (2007). Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Appl Soil Ecol* **36**: 147–155.
- Singh BK, Nunan N, Ridgway KP, McNicol J, Young JPW, Daniell TJ, *et al.* (2008). Relationship between assemblages of mycorrhizal fungi and bacteria on grass roots. *Environ Microbiol* **10**: 534–541.
- Šnajdr J, Dobiášová P, Urbanová M, Petránková M, Cajthaml T, Frouz J, *et al.* (2013). Dominant trees affect microbial community composition and activity in post-mining afforested soils. *Soil Biol Biochem* **56**: 105–115.
- Šnajdr J, Valášková V, Merhautová V, Herinková J, Cajthaml T, Baldrian P. (2008). Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biol Biochem* **40**: 2068–2075.
- Sokolova TG, Gonza JM, Kostrikina NA, Chernyh NA, Slepova T V, Bonch-Osmolovskaya EA, *et al.* (2004). *Thermosinus carboxydivorans* gen. nov., sp. nov., a new anaerobic, thermophilic, carbon-monoxide-oxidizing, hydrogenogenic bacterium from a hot pool of Yellowstone National Park. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2353–2359.
- Steinauer K, Chatzinotas A, Eisenhauer N. (2016). Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecol Evol* **6**: 7387–7396.
- Stevens CJ, Dise NB, Mountford O, Gowing D. (2004). Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. *Science (80- )* **303**: 1876–1880.

Štursová M, Baldrian P. (2011). Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant Soil* **338**: 99–110.

Štursová M, Bárta J, Šantrůčková H, Baldrian P. (2016). Small-scale spatial heterogeneity of ecosystem properties, microbial community composition and microbial activities in a temperate mountain forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* **92**: fiw185.

Štursová M, Žifčáková L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P. (2012). Cellulose utilization in forest litter and soil: Identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiol Ecol* **80**: 735–746.

Suksaard P, Pathom-Aree W, Duangmal K. (2017). Diversity and plant growth promoting activities of Actinomycetes from mangroves. *Chiang Mai J Sci* **44**: 1210–1223.

Taberlet P, Coissac E, Gielly L, Miquel C, Brochmann C, Valentini A, *et al.* (2007). Power and limitations of the chloroplast trn L ( UAA ) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res* **35**: 1–8.

Tanasupawat S, Phongsopitanun W, Suwanborirux K, Ohkuma M, Kudo T. (2016). *Nocardia rayongensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 1950–1955.

Tariq U, Riaz A, Jaskani MJ, Zahir ZA. (2016). Screening of PGPR isolates for plant growth promotion of *Rosa damascena*. *Int J Agric Biol* **18**: 997–1003.

Tedersoo L, Bahram M, Cajthaml T, Põlme S, Hiiesalu I, Anslan S, *et al.* (2016). Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J* **10**: 346–362.

Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I. (2008). Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytol* **180**: 479–490.

Thevenon F, Regier N, Benagli C, Tonolla M, Adatte T, Wildi W, *et al.* (2012). Characterization of fecal indicator bacteria in sediments cores from the largest freshwater lake of Western Europe ( Lake Geneva , Switzerland ). *Ecotoxicol Environ Saf* **78**: 50–56.

Thomson AJ, Giannopoulos G, Pretty J, Baggs EM, Richardson DJ. (2012). Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philos Trans R Soc* **367**: 1157–1168.

Tláškal V, Voříšková J, Baldrian P. (2016). Bacterial succession on decomposing leaf litter exhibits a specific occurrence pattern of cellulolytic taxa and potential decomposers of fungal mycelia. *FEMS Microbiol Ecol* **92**: 1–10.

- Urbanová M, Šnajdr J, Baldrian P. (2015). Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. *Soil Biol Biochem* **84**: 53–64.
- Valtera M, Šamonil P, Svoboda M, Janda P. (2015). Effects of topography and forest stand dynamics on soil morphology in three natural *Picea abies* mountain forests. *Plant Soil* **392**: 57–69.
- Venturi V, Keel C. (2016). Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci* **21**: 187–198.
- Větrovský T, Baldrian P. (2013). Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing : current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. *Biol Fertil Soils* **49**: 1027–1037.
- Vorholt JA. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**: 828–840.
- de Vries FT, Manning P, Tallowin JRB, Mortimer SR, Pilgrim ES, Harrison KA, *et al.* (2012). Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecol Lett* **15**: 1230–1239.
- Wang Y, Liu W, Feng W-W, Zhou X-Q, Juan B, Ju X-Y, *et al.* (2015). *Nocardia rhizosphaerae* sp . nov ., a novel actinomycete isolated from the coastal rhizosphere of *Artemisia* Linn ., China. *Antonie Van Leeuwenhoek* **108**: 31–39.
- Wardle DA. (2006). The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecol Lett* **9**: 870–886.
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomosw JN, Setälä H, Putten WH van der, Wall DH. (2004). Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science (80- )* **304**: 1629–1633.
- Williams BL, Shand CA, Sellers S, Young ME. (1999). Impact of synthetic sheep urine on N and P in two pastures in the Scottish uplands. *Plant Soil* **214**: 93–103.
- Wilson JB, Peet RK. (2012). Plant species richness : the world records. *J Veg Sci* **23**: 796–802.
- Yabe S, Aiba Y, Sakai Y, Hazaka M, Yokota A. (2011). *Thermogemmatispora onikobensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogemmatispora foliorum* sp. nov., isolated from fallen leaves on geothermal soils, and description of *Thermogemmatisporaceae* fam. nov. and *Thermogemmatisporales* ord. no. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 903–910.
- el Zahar Haichar F, Heulin T, Guyonnet JP, Achouak W. (2016). Stable isotope probing of carbon flow in the plant holobiont. *Curr Opin Biotechnol* **41**: 9–13.

