

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

**Charles University  
Faculty of Science**

**Doktorský studijní program: Mikrobiologie  
Ph.D. study program: Microbiology**



Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis

**Molekulární biologie a ekologie rozkladu rostlinných biopolymerů v lesních  
ekosystémech mikroorganismy**

**Molecular biology and ecology of microbial decomposition of plant-derived biopolymers  
in forest ecosystems**

**Lucia Žifčáková**

Školitel/Supervisor: RNDr. Petr Baldrian, PhD.

Prague, 2017

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*



Obor: Mikrobiologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Školící pracoviště: Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Lucia Žifčáková

Školitel: RNDr. Petr Baldrian, Ph.D

Oponenti: Jiri Barta, Ph.D.

doc. Ing. Ondrej Uhlík, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba se koná dne: ..... v ..... hod.

kde .....

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy

## Obsah

Česká část autoreferátu.....	5
Abstrakt .....	5
Úvod .....	5
Hypotézy a cíle práce .....	8
Metody .....	8
Výsledky a diskuse.....	8
Závěr.....	10
English part of the summary .....	11
Abstract .....	11
Introduction .....	12
Aims and Hypotheses.....	14
Methods.....	14
Results and Discussion.....	14
Conclusions .....	17
Publications used to obtain Ph.D. degree:.....	17
Lucia Žifčáková – Curriculum vitae .....	18
References .....	20

# Česká část autoreferátu

## Abstrakt

V této dizertační práci byly studovány schopnosti hub a bakterií degradovat jednoduché a komplexní uhlíkaté sloučeniny pocházející z různých zdrojů, jako jsou kořenové exudáty, opad, půdní organická hmota nebo houbové mycelium. Znalost funkčních vlastností, zejména degradačních schopností hub a bakterií, je důležitá pro objasnění otázky jakým způsobem fungují mikroorganismy v půdě, tak, aby bylo možné modelovat a předpovídat budoucí směry vývoje mikrobiálních společenstev tvářící v tvář globálním změnám. U sbírkových kmenů hub s různou taxonomií a ekofyziologií byla ekofyziologie významnější determinantou funkčních vlastností než taxonomie. U bakteriálních izolátů z opadu a půdy smrkového lesa bylo potvrzeno, že acidobakterie produkují širokou škálu enzymů ve velkém množství *in vitro*, a že jsou rovněž hojně zastoupeny a aktivně se účastní procesů rozkladu v kyselé smrkové půdě. Expresse degradačních enzymů u bakterií i hub byly dále studovány *in situ* v půdě smrkového lesa, která představuje důležité životní prostředí, zejména s ohledem na široké rozšíření jehličnatých lesů na severní polokouli. Naše znalosti, pokud jde o pochopení sezónního vlivu na mikrobiální aktivitu, jsou dosud nedostatečné. Z tohoto důvodu byl studován vliv sezónnosti na celkovou transkripci hub a bakterií v opadu a půdě. Stejně experimentální uspořádání bylo použito pro srovnání genetického potenciálu a transkripce enzymů, podílejících se na cyklu uhlíku, jakož i na sezónnost jejich transkripce u hub a bakterií, včetně enzymu  $\beta$ -glukosidázy, zapojeného do posledního kroku degradace celulózy. Zaměření na sezónnost je motivováno očekáváním, že sezónní změny množství fotosyntátů, produkovaných stromy v lese, a tím i změny v množství kořenových exudátů mezi létem a zimou, budou mít vliv na půdní společenstvo mikrobů, a hlavně na ektomykorhizní houby (ECM). Nižší transkripční aktivita ECM a vyšší množství bakteriálních transkriptů v zimním období bylo skutečně pozorováno. Ukázalo se, že letní a zimní mikrobiální společenstva se liší mírou transkripce funkčních skupin enzymů. To je zejména patrné v půdě, což pravděpodobně odráží změny dostupnosti organických látek v průběhu roku; změny ve složení mikrobiálních společenstev nebyly pozorovány. V zimě jsme pozorovali vyšší míru využití zásobních látek a vyšší výskyt bakteriálních transkriptů, zatímco v létě byly spíše využívány komplexní zdroje C převážně a projevila se vysoká aktivita basidiomycet, které ve studované půdě zahrnují zejména ECM houby. Při zacílení na  $\beta$ -glukosidázu bylo demonstrováno, že i PCR amplikony z částečné genové sekvence mohou být užitečným ukazatelem diverzity i zapojení bakterií a hub do degradace celulózy a sezónnosti transkripce tohoto enzymu. Avšak kompletní diverzita nemůže být amplikonovým sekvenováním popsána, protože amplifikační primery opomíjejí některé organismy. Výsledky ukazují, že výsledky naznačují, že pro degradaci komplexní půdní organické hmoty houbami je potřebný „priming“ efekt jednoduchých sloučenin uhlíku

## Úvod

Lesy mají důležitou úlohu v globální bilanci uhlíku (C) a houby s bakteriemi hrají klíčovou roli jako dekompozitoři (Trivedi *et al.*, 2013). Pro pochopení mikrobiálních procesů v lesní půdě je třeba zkoumat aktivitu současně bakterií i hub současně. I když jsou bakterie v půdě dominantní, co se týče množství biomasy, houby jsou aktivnější v rozkladných procesech a propojují půdu s rostlinami (Baldrian *et al.*, 2012; Stursova *et al.*, 2012). Kyselé lesní smrkové půdy vykazují vertikální stratifikaci v důsledku akumulace opadu na povrchu půdy a postupující degradaci opadu směrem k hlubším vrstvám. Mezi opadem a

půdním horizontem existují rozdíly v enzymatické aktivitě, množství mikrobiální biomasy a ve složení mikrobiálního společenstva - pokles bakteriální a houbové biomasy a zvýšení množství ECM hub se stoupající hloubkou půdy (Baldrian *et al.*, 2012; Clemmensen *et al.*, 2013; Lindahl *et al.*, 2007; Voriskova *et al.*, 2014). V opadu je uhlík zastoupen hlavně ve formě rostlinného materiálu, který se skládá z celulózy (35-50%), hemicelulózy (20-50%) a ligninu (10-35%) (Van Dyk a Pletschke, 2012). Půda je typická nižším poměrem C: N než opad, nižším množstvím organických látek, mikrobiální biomasy a aktivity než opad a vysokým obsahem humusových látek a stabilní půdní organické hmoty (SOM) (Snajdr *et al.*, 2008). Významným zdrojem C v půdním horizontu pro symbiotické houby a bakterie, asociované s kořeny, jsou kořenové exudáty stromů jako primárních producentů (Baldrian *et al.*, 2012; Clemmensen *et al.*, 2013; Churchland *et al.*, 2012; Lindahl *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2005). Přibližně 30% rostlinné primární produkce je alokované do kořenů a půdy (Beidler *et al.*, 2015) a je složeno převážně ze sacharidů, aminokyselin a organických kyselin, mastných kyselin, aromatických a alifatických kyselin s nízkou molekulární, hormonů a enzymů (Phillips *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016; Prescott a Grayston 2013). Aby houby a bakterie mohli využívat různé uhlíkaté sloučeniny, musí je nejprve rozložit na mono- nebo disacharidy a v této formě mohou být přenášeny přes mikrobiální buněčné stěny (Burns a Dick 2002; De Vries *et al.*, 2012). Komplexní organické sloučeniny C, nacházející se v opadu a půdě, jsou degradovány pomocí glykosid hydroláz (GH), které štěpí glykosidické vazby (nacházející se např. v celulóze a hemicelulóze) a také enzymy s pomocnou redoxní aktivitou (AA). GH a AA patří k enzymům, jejichž substrátem jsou uhlíkaté biopolymery (tzv. CAZymes) a jsou klasifikovány do skupin podle podobnosti jejich sekvencí a proteinových struktur (Lombard *et al.*, 2014).

Houby, nejčastěji asko- a basidiomycety, jsou známe svou schopností rozkládat buněčné stěny rostlin a používají na to různé CAZymy. I přes hromadící se poznatky je naše znalost produkce enzymů u různých ekofyziologických a taxonomických skupin hub stále omezená. Několik studií se pokusilo využít pro předpověď aktivity enzymů údaje, získané sekvenací genomů. V analýze houbových genomů byla největší pozornost věnována obsahu genů kódujících ligninolytické enzymy a CAZymy u druhů s různou ekofyziologií, jako jsou se dřevem asociované houby bílé hniloby (WR) a hnědé hniloby (BR), mykorhizní houby, rostlinní patogeni a další houby s různou fylogenetickou příbuzností (Kohler *et al.*, 2015; Floudas *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Různé houbové taxony kódují v genomu různé sady extracelulárních enzymů a složení těchto enzymatických setů se mezi vyššími taxony liší (Baldrian, 2008; Zhao *et al.*, 2013). Omezený počet sekvenovaných genomů umožňuje pouze porovnání na hrubé úrovni taxonomických oddělení, a tyto výsledky se zdají být ovlivněny různým zastoupením jednotlivých ekofyziologických skupin mezi těmito odděleními (Zhao *et al.*, 2013).

Velmi četnou ekofyziologickou skupinou hub v opadu jsou basidiomycety rozkládající opad (LDF), které jsou charakteristické saprotrofním životním stylem a často tvoří silné myceliální provazce. LDF jsou podobné WR co do spektra produkovaných enzymů, jako jsou například ligninolytické oxidázy a různé peroxidázy (Hatakka 2001; Martinez *et al.*, 2005; Steffen *et al.*, 2002). Další důležitou ekologickou skupinou hub jsou saprotrofní mikroskopické houby (SA), které často patří mezi askomycety a zygomycety. SA vykazují podobnou celulólytickou aktivitu jako saprotrofními basidiomycety, ale vyšší produkci chitináz (Baldrian *et al.*, 2011). Saprotrofní houby lze také rozdělit do ekologických skupin na základě jejich schopnosti degradovat lignin. Houby bílé hniloby zanechávají napadené dřevo bílé a obohacené o celulózu, protože degradují nejdříve lignin a hemicelulózu. WR obsahují enzymy, jako je manganová peroxidáza, verzatilní peroxidáza a ligninová peroxidáza, které jim pomáhají narušit aromatické kruhy v molekulách ligninu. BR houby jsou hlavně basidiomycety, rostoucí nejčastěji na měkkém dřevu a rozkládající lignin pouze částečně, což má za následek

hnědý vzhled dřeva, v němž zůstává zejména oxidovaný lignin (Martinez *et al.*, 2005). Lignin je oxidován odlišným mechanismem než u WR, a to Fentonovou reakcí (Baldrian a Valaskova 2008). Nejdůležitější rozdíl mezi BR a WR houbami je absence ligninolytických peroxidáz u BR (Riley *et al.*, 2014). Mykorrhizní houby jsou nutričně závislé na hostitelské rostlině jako zdroji uhlíku. V lesech mírného a severského pasu je více než 90% stromů zapojeno v ektomykorrhizní symbióze (ECM) (Markkola 1996).

Také bakterie slouží jako důležitý, i když méně prozkoumaný zdroj enzymů, zapojených do rozkladu rostlinných pletiv (Berlemont a Martiny 2015) a taktéž významně přispívají k rozkladu organické hmoty (Brown a Chang, 2014; Eichorst a Kuske, 2012; Lopez-Mondejar *et al.*, 2016; Stursova *et al.*, 2012, Tian *et al.*, 2013). Půdní bakterie také přispívají k rozkladu fenolických sloučenin, jako je lignin, i když účinnost jejich degradace je obvykle mnohem nižší než u hub (Brown a Chang, 2014; Vetrovsky *et al.*, 2014). Celulolytické bakterie lze nalézt ve všech hlavních taxonomických odděleních, jako jsou Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes a Firmicutes (Berlemont *et al.*, 2014; Himmel *et al.*, 2010; Jimenez *et al.*, 2014; Koeck *et al.*, 2014; Lopez-Mondejar *et al.*, 2016; Sukharnikov *et al.*, 2011). Díky sekvenování bakteriálních genomů bylo zjištěno, že některé funkční vlastnosti, jako je exprese chitináz nebo celuláz, vykazují různou úroveň konzervace v rámci fylogeneze (Berlemont a Martiny, 2013; Martiny *et al.*, 2013; Zimmerman *et al.*, 2013). Nicméně nedávné výsledky podporují názor, že pouze genomové analýzy samy o sobě nestačí k predikci produkce enzymů a je třeba je doplnit o měření enzymů nebo degradační testy různých substrátů.

Velká hojnost výskytu bakterií patřících mezi Acidobacteria, Actinobacteria a Proteobacteria u lesních půd (Kuffner *et al.*, 2012; Kurth *et al.*, 2013; Lipson 2007; Nacke *et al.*, 2011; Uroz *et al.*, 2013) se zdá být indicií pro jejich funkční význam. Výskyt acidobakterií pozitivně koreluje s kyselým pH a negativně s dostupností C v půdě, což naznačuje, že patří mezi pomalu rostoucí oligotrofy přizpůsobené na nedostatek živin (Garcia-Fraile *et al.*, 2016; Fierer *et al.*, 2007; Naether *et al.*, 2012). Acidobakterie jsou charakteristické adaptabilitou na změny prostředí a vysokým stupněm metabolické všestrannosti, který jim umožňuje rozkládat komplexní komponenty SOM (Naether *et al.*, 2012; Rasche *et al.*, 2011).

Množství a složení mikrobiálních společenstev v půdě se mění během ročních období, což je způsobeno výkyvy teplot a množství srážek, stejně jako sezónností v růstu rostlin (Hogberg *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2010; Voriskova *et al.*, 2014). Bylo ukázáno, že dominance saprotrofních hub na jaře koreluje s jarním obratem kořenové biomasy (Satomura *et al.*, 2006), zatímco převaha ECM v pozdním létě (Davey *et al.*, 2012; Jumpponen *et al.*, 2010; Santalahti *et al.*, 2016; Voriskova *et al.*, 2014; Wallander *et al.*, 2001) je podpořena maximálním růstem kořenů stromů (Stober *et al.*, 2000). Není však známo, zda se změny mikrobiálního společenstva, popsané v opadavých lesích (Lopez-Mondejar *et al.*, 2015; Voriskova *et al.*, 2014) také vyskytují v lesích jehličnatých.

Ačkoliv bylo prokázáno, že letní mikrobiální komunita je přizpůsobena k využití jednoduchých zdrojů C, jako jsou třeba kořenové exsudáty (Dennis *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2009), existují náznaky, že tyto zdroje C mohou také podpořit rozklad jinak těžko rozložitelné SOM pomocí takzvaného „priming efektu“ (Kuzyakov 2010; Talbot *et al.*, 2008), jako je tomu v případě rozkladu SOM ECM houbami při jejich hledání zásob organického dusíku (N) (Lindahl a Tunlid 2015). Gadgil a Gadgil v roce 1975 navrhli, že aktivita ECM hub inhibuje degradační pmocí saprotrofních hub v létě tím, že dokážou efektivněji využívat živiny, jako například dusík. Z existence tohoto tzv. "Gadgil" efektu jsme vycházeli při návrhu hypotézy, že v zimě, kdy je aktivita ECM nižší, bude aktivita dekompozičních procesů vyšší. Podle tohoto předpokladu by se měl pokles v poměru ECM a saprotrofních hub v zimě odrazit na nárůstu produkce extracelulárních enzymů rozkládajících SOM.

## Hypotézy a cíle práce

Cílem mé dizertační práce bylo objasnění role hub a bakterií v rozkladných procesech a popis změn, které mikrobiální společenstva podstupují během roku, s důrazem na transkripci genů kódujících enzymy zapojené do rozkladných procesů. Bylo sledováno, zda má na produkci různých degradačních enzymů za stejných růstových podmínek větší vliv houbová ekofyziologie nebo taxonomická příslušnost. Pokusila jsem se odpovědět na otázku, zda sezónnost v produkci kořenový exudátů ovlivňuje složení mikrobiálních společenstev, stejně jako využití různých zdrojů C. Dalším cílem mé disertační práce bylo stanovení úlohy bakterií při rozkladu různých organických sloučenin *in vitro* a jejich role v cyklu uhlíku *in situ* v lesní půdě. Užitečnost sekvenace celkové DNA a PCR amplikonů byla rovněž zkoumána u genu pro  $\beta$ -glukosidázu, který je velmi hojný jak u bakterií, tak u hub v půdním prostředí.

## Metody

Pro charakterizaci ekofyziologie hub a bakterií byly mikroorganismy kultivovány a byly měřeny jejich enzymatické aktivity nebo jejich schopnost růstu na různých substrátech. Enzymové aktivity byly dále měřeny ve vzorcích půdy a opadu a byla stanovena míra transkripce funkčních genů pomocí sekvenace metatranskriptomu. Byly připraveny DNA a RNA knihovny s cílem určit, které funkční geny jsou zakódovány v mikrobech smrkové lesní půdy, a které mohou být aktivní v rozkladu různých sloučenin uhlíku. Primery pro amplifikaci houbové  $\beta$ -glukosidázy byly navrženy a použity pro DNA a RNA stejného společenstva mikroorganismů.

## Výsledky a diskuse

Široké spektrum hub produkovalo řadu enzymů, mezi nimiž byly zejména fosfatázy, potřebné pro zásobení fosforem,  $\beta$ -glukosidázy štěpící disacharidy a oligosacharidy a N-acetylglukosaminidázy, které rozkládají chitin v houbové stěně a hrají roli v růstu a recyklaci dusíku. Méně často byly pozorovány "postradatelné" enzymové aktivity, například aktivity některých hemiceluláz a lakázy.

Ačkoli naše studie byla omezena na 112 kmenů hub a na měření enzymatické aktivity u 19 různých enzymů, bylo zjištěno, že se ekofyziologické skupiny hub liší přítomností a aktivitou enzymů. Saprotrofní mikroskopické houby (SA) a BR houby se produkcí enzymů odlišovaly od jiných skupin hub i od sebe navzájem, přičemž složení enzymatických systémů WR a LDF bylo podobné. Ve shodě s větším dopadem ekofyziologie než taxonomie na produkci enzymů, bylo ukázáno při analýzách genomů a proteomů řádu *Polyporales* (Basidiomycota), že WR a BR taxony se liší množstvím kódovaných a produkovaných genů pro hydrolázy glykosidů, v obou případech s vyšším zastoupením u WR (Hori *et al.*, 2013), což odpovídá i našim výsledkům porovnání BR a WR zástupců řádu *Polyporales*. Vztah mezi aktivitou a genomovým potenciálem není jednoduchý z mnoha důvodů a rozdíly ve fenotypu nejsou vysvětleny jen obsahem genomové informace, ale důležitou roli hraje také regulace genové exprese.

Další součástí mé dizertační práce bylo porovnání degradačních schopností bakterií izolovaných z kyselé smrkové lesní půdy a opadu. Mezi 299 izoláty z agarových misek o pH 4,5 byly nejčastěji zastoupené Proteobacteria (66%), Actinobacteria (17%), a Acidobacteria (13%), což odpovídalo také složení společenstev kyselé smrkové půdy v předchozích studiích (Baldrian *et al.*, 2012; Stursova *et al.*, 2012).

Nejčastěji produkovanými enzymy u bakteriálních izolátů byly fosfomonoesteráza,  $\beta$ -glukosidáza a arylsulfatáza. Ačkoli použití měření enzymatických aktivit jako ukazatelů funkčnosti v půdě je stále problémem kvůli prostorově-časovým změnám v reálném prostředí



a obtížnosti propojení činnost jednotlivých enzymů s jejich úlohou v koloběhu živin (Nannipieri et al, 2012; Uksa et al., 2015), vysoká produkce  $\beta$ -glukosidáz, exoceluláz a N-acetylglukosaminidáz u izolátů acidobakterií a u zástupců Bacteroidetes naznačuje jejich schopnost degradovat chitin a oligosacharidy, pocházející z rostlin, za kyselých podmínek. Studie Rawat *et al.* (2012) ukázala, že geny nutné pro degradaci celulózy, hemicelulózy a chitinu byli nalezeni ve všech úplných genomech Acidobakterií. To naznačuje klíčovou úlohu Acidobacteria (zejména oddělení 1) v procesech cyklu C v půdě jehličnatého lesa a jejich genomický potenciál může být skutečně realizován. To by bylo v rozporu s popisem acidobakterií jako komenzálů (de Boer *et al.*, 2005).

Dále jsem se zaměřila na schopnosti degradace bakterií a hub *in situ* – v půdě a opadu smrkového lesa s využitím metagenomiky a metatranskriptomiky. Rané molekulární studie nebraly v potaz rozdíly mezi aktivními a neaktivními mikroorganismy, přestože velká část mikroorganismů je v daném prostředí a okamžiku neaktivní (Bakken 1997). V dizertační práci jsem použila metatranskriptomický přístup k prozkoumání vlivu sezónních změn v transkripci degradačních enzymů u mikroorganismů opadu a půdy smrkového lesa. Zjistila jsem, že 74% funkčních genů bylo odlišně exprimováno mezi opadem a půdou, s houbovými transkripty dominujícími v opadu a bakteriálními v půdě. Všeobecně vzato, složení společenstev mikroorganismů, charakterizované sekvenací ampliconů DNA i RNA, nepodléhalo výrazným změnám v čase. Sezónní změny se projevíly hlavně v aktivitě jednotlivých taxonů, jakož i funkčních skupin a byly výraznější v půdě než v opadu. V zimě jsme zaznamenali vzestup transkriptů pro degradaci RNA, proteozomu a lysozomu, což naznačuje sníženou aktivitu mikrobiální komunity a recyklaci biomasy. Naopak v létě byly více transkribovány geny zapojené do signálních drah nebo metabolismu, což svědčí o vysoké aktivitě mikrobiální komunity. Nejvýraznější rozdíl mezi létem a zimou v transkripci byl zaznamenán v půdě, kde bylo 33,4% houbových genů (60% gen ECM hub) nadměrně exprimováno v létě, zatímco pouze 15,7% (15% u ECM hub) v zimním období. Sezónnost kořenových procesů, jako je omezení toku C do kořenů v zimě v důsledku omezené fotosyntézy a vyšší dostupnost jednoduchých uhlíkatých látek v létě může vysvětlit sezónnost v transkripci hub, které se vyskytují více v rhizosféře než v okolní půdě (Turner *et al.*, 2013). Dále bylo studováno jaký vliv má sezónnost na enzymy zapojené do cyklu uhlíku (CAZymes) a jak velký je podíl bakterií a hub na jejich expresi v lesní půdě. Zaměřila jsem se na porovnání potenciální aktivity (metagenom) a transkripce enzymů (metatranskriptom). Složení metagenomů bylo dříve často považováno za odraz fungování mikrobiálního společenstva (Fierer *et al.*, 2012) a to navzdory skutečnosti, že spojení mezi obsahem genomu a expresí u jednotlivých bakterií a hub není jednoznačné (Lopez-Mondejar *et al.*, 2016). Více bakteriálních sekvencí jsme našli v metagenomu než v metatranskriptomu, přičemž korelace mezi zastoupením genů v metagenomu a jejich transkripcí nebyl prokázán. Vyšší podíl bakteriálních CAZymů k houbovým v poměru 2,5:1 v metagenomu, může být způsobeno lepší anotací bakteriálních genů, které neobsahují introny. V metatranskriptomu byl poměr počtu transkriptů bakterií a hub 1:1,9 ve prospěch hub. Podíl houbových transkriptů byl v této studii mnohem vyšší než v jiných obdobných studiích, například z javorového lesa nebo rašeliniště, kde byly bakteriální CAZymy 2,6 až 5-krát hojnější než enzymy hub (Hesse *et al.*, 2015; Ivanova *et al.*, 2016). To naznačuje důležitost hub v jehličnatém lese. Vysoký podíl houbových CAZymů je v souladu s výsledky proteomické analýzy bukového opadu, kde také dominovaly houbové proteiny (Schneider *et al.*, 2012). Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes a Actinobacteria byly nejdůležitějšími bakteriálními producenty CAZymů ve smrkovém lese jakož i v kyselém severském rašeliništi (Ivanova *et al.*, 2016). Široké spektrum bakterií bylo schopno využívat substrátů jako je škrob, celobioza nebo jiné oligosacharidy, ale bakterie byly také důležitými producenty chitinolytických enzymů, což potvrzuje jejich roli v obratu houbové biomasy (Brabcova *et al.*, 2016). Rozkladu ligninu, celulózy a xylanu dominovaly houby, které jsou,

jak se zdá, vybaveny pro rozklad těžko rozložitelných substrátů rostlinného původu (van der Wal *et al.*, 2013). Relativní podíl na transkripci CAZymů se v zimě v půdě zvýšil u bakterií (jako jsou Acidobacteria) a ascomycet na úkor basidiomycet (pravděpodobně ECM hub). To může naznačovat ukončení inhibice nemykorhizních mikroorganismů v důsledku účinku „Gadgil efektu“ (Fernandez a Kennedy 2016), nebo jenom snížení aktivity ECM hub. Skutečnost, že se v zimních měsících zvyšuje využití zásobních látek (glykogenu, škrobu a trehalózy) ukazuje, že biomasa musí být udržována na úkor metabolických rezerv. Již v minulosti bylo pozorováno využití trehalosy a mannitolu jako energetických rezerv u ECM během zimního hladovění (Druebert *et al.*, 2009; Nehls 2008). V rozporu s naším očekáváním, nepřešla mikrobiální společenstva v půdě z využívání jednoduchých C látek v létě na komplexní biopolymery v zimě a geny pro enzymy rozkládající lignin, celulózu a xyланu byly více transkribovány v létě, což naznačuje možnou účast jednoduchých organických látek při rozkladu komplexních biopolymerů prostřednictvím tzv. "priming" efektu, a to hlavně u hub. Komunita transkriptů amplikonů  $\beta$ -glukosidázy byla typicky méně různorodá než DNA komunita, což naznačuje, že jen část mikrobiální komunity byla metabolicky aktivní. Protože většina z analyzovaných hub a bakterií obsahuje více než jeden  $\beta$ -glukosidázový gen (Lopez Mondejar *et al.*, 2016), lze jenom zhruba popsat rozmanitost taxonů, které tento gen v lesní půdě exprimují. Mezi 16% a 30% z předpokládaných houbových  $\beta$ -glukosidázových genů patřících do GH1 rodiny bylo přepisováno, zatímco pro GH3 to bylo 23 až 69%. Houbové  $\beta$ -glukosidázy z rodiny GH1 byly přiřazeny k askomycetům a u GH3 k ascomycetům a basidiomycetům. GH1 transkripty patřící zástupcům oddělení Basidiomycota v metatranskriptomu byly 1,5x hojnější ty patřící kmeni Ascomycota, zatímco v případě GH3 měli Basidiomycota a Ascomycota podobné zastoupení. U bakteriální GH1  $\beta$ -glukosidázy bylo přepisováno 40 - 63% genů, kódovaných v DNA, u GH3 to bylo 19 až 52%. Mezi bakteriálními sekvencemi dominovaly ty od zástupců Actinobacteria a Proteobacteria u GH1, zatímco u GH3 nejvíce sekvencí patřilo kmenům Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria a Acidobacteria. Berlemont a Martiny (2013) uvádí, že geny pro  $\beta$ -glukosidázy jsou přítomny u zástupců téměř všech bakteriálních kmenů což potvrzují naše výsledky. Výsledky ukázaly zřetelnou distribuci nejhojnějších mikrobiálních  $\beta$ -glukosidáz mezi oběma horizonty v různých ročních obdobích pro obě rodiny (GH1 a GH3); sezóny více ovlivňovaly transkripci genů rodiny GH3. Sezónní rozdíly se nepotvrdily u aktivity enzymu, což ukazuje na omezení metatranskriptomové analýzy, které může vyřešit analýza metaproteomů. Výsledky také ukazují, že kompletní diverzita jednoho funkčního genu, jako je  $\beta$ -glukosidáza, nemůže být zachycena jenom sekvenováním amplikonů, kvůli využití primerů navržených pomocí omezených databází a tudíž je sekvenace celkové DNA v tomhle ohledu vhodnější.

## Závěr

V mojí Ph.D. práci jsem potvrdila hypotézu, že schopnosti degradace saprotrofních hub jsou utvářeny kombinací jejich ekofyziologie a taxonomie, přičemž ekofyziologie je mnohem důležitější. Když jsem se zaměřila na roli bakterií izolovaných z lesní půdy v degradaci sloučenin C, zástupci kmene Proteobacteria byli schopni využít nejširší spektrum zdrojů C, ale acidobakterie z oddělení 1 se ukázaly být hojné v kyselé smrkové půdě a také aktivní v rozkladu organické hmoty. Nesrovnalosti mezi informací v genomech a měřením aktivity upozorňuje na nutnost funkčních studií u hub a bakterií, které jsou nezbytné pro spolehlivé vyhodnocení fyziologických schopností těchto skupin mikroorganismů. Hypotéza o fotosyntéze jako hlavní hnací síle sezónnosti v půdě získala podporu zejména faktem, že podíl ektomykorhizních hub na mikrobiální transkripci v zimě klesnul. Na druhé straně, složení společenstev mikroorganismů bylo v čase stabilní a zásadní sezónní změny byly

nalezeny pouze v mikrobiální transkripci. Transkriptomické data o enzymech zapojených do procesu degradace uhlíkatých látek naznačují, že kořenové exudáty mohou pomoci v rozkladu rekalcitrantních forem C mikroby v létě pomocí tzv. "priming" efektu. Zatímco použití zásobních látek, jako je škrob nebo trehalóza je v zimě hojně, léto se vyznačuje vysokou mírou transkripce ligninolytických, celulolytických a xylanolytických enzymů, které se podílejí na degradaci komplexní frakce rostlinné biomasy.

Fakt, že houby rozkládají komplexnější substráty než bakterie, koresponduje s jejich vyšším podílem na transkripci v opadu, zatímco v půdě je podíl bakterií a hub na transkripci vyrovnaný. Výsledky potvrdily, že mikrobiální producenti  $\beta$ -glukosidáz se liší mezi opadem a půdou a že rozdíly v transkripci  $\beta$ -glukosidáz existují jak mezi horizonty tak mezi létem a zimou. Srovnáme-li výsledky amplikonového sekvenování a sekvenace celkové DNA/RNA, vyšší rozmanitost a četnosti byly nalezeny v druhém případě.

## English part of the summary

### Abstract

The abilities of fungi and bacteria to degrade simple and complex C compounds derived from different sources, such as root exudates, litter, soil organic matter or fungal mycelium were studied in this dissertation. Knowledge of functional traits, especially degradation abilities of fungi and bacteria, are important for deciphering the black box of microbial functioning in topsoil and thus aiding in modeling and predicting future directions of microbial communities development in face of global changes. Among fungal cultures from culture collection representing strains with different taxonomy and ecophysiology, the ecophysiology of fungi was more important in manifestation of functional traits than taxonomy. Among bacterial isolates from the litter and soil of spruce forest, Acidobacteria were confirmed to express multiple decomposition enzymes in high rates *in vitro* and were also abundant and active degraders in acidic spruce forest soil. The expression of degradation capacities of both bacteria and fungi were further studied *in situ* in spruce forest topsoil, that represents an important environment due to the ubiquity of coniferous forests on the Northern hemisphere. There is an obvious gap of knowledge, when it comes to our understanding of seasonal effect on microbial functioning, and this is why the effect of seasonality on transcription of all functional genes of fungi and bacteria was also addressed. The same experimental set-up was used to compare the encoded and transcribed capacity of enzymes involved in the C cycle as well as seasonality of their production by fungi and bacteria including  $\beta$ -glucosidase, the enzyme involved in the last step of complete cellulose degradation. The focus on seasonality was motivated by the expectation that the seasonal change in the amount of photosynthates produced by trees in forest and thus the changes in the amount of root exudates between summer and winter affect diverse soil microbiota but mostly ectomycorrhizal fungi (ECM). Indeed, lower transcription activity of ECM and higher abundance of bacterial transcripts in metatranscriptome was observed in winter. It was shown that summer and winter microbial communities used different enzyme sets, especially in soil, which probably reflects distinct C compounds available to microorganisms through the year, although microbes did not change their abundance or composition. In winter, the use of storage compounds and higher abundance of bacterial transcripts was observed, while in summer, complex C sources were used mostly by Basidiomycota that largely represented ECM members in studied soil. When targeting  $\beta$ -glucosidase, PCR amplicons of partial gene sequence were demonstrated to be a useful proxy of diversity and the involvement of both bacteria and fungi in cellulose degradation and seasonal patterns of enzyme transcription were observed. However, the full diversity could not be obtained by amplicon sequencing since amplification primers miss

some organisms. Overall, the result indicate that simple C compounds have priming effect on and are required for the fungal degradation of recalcitrant soil organic matter.

## Introduction

Forests play an important role in the global carbon (C) balance and fungi and bacteria play a crucial role as decomposers in C turnover (Trivedi *et al.*, 2013). For the understanding of microbial processes in forest soil, it is necessary to examine the activity of both bacteria and fungi at the same time. Although bacteria dominate in the terms of biomass, fungi are more active in decomposition processes and create link among soil and plants (Baldrian *et al.*, 2012; Stursova *et al.*, 2012).

Acidic spruce forest soils show vertical stratification as a result of litter accumulation on top of the soil and its continuous decomposition towards deeper soil horizons. There are differences in enzymatic activities, amount of microbial biomass and microbial community composition (decrease of bacterial and fungal biomass and increase of ECM fungi with soil depth) between litter and soil horizon (Baldrian *et al.*, 2012; Clemmensen *et al.*, 2013; Lindahl *et al.*, 2007; Voriskova *et al.*, 2014). In litter, C pool is represented by plant material that is composed of cellulose (35–50 %), hemicelluloses (20–50 %) and lignin (10–35 %) (Van Dyk and Pletschke, 2012). Soil is typical by lower ratio of C:N than litter, lower amount of organic matter relative to litter and high content of humic material, higher resiliency of SOM and smaller amount of microbial biomass and activity (Snajdr *et al.* 2008). An important source of C in soil horizon available for symbiotic fungi and root-associated bacteria are root deposits form trees as primary producent, either exudates or C transferred directly to mycorrhizal fungi (Baldrian *et al.*, 2012; Clemmensen *et al.*, 2013; Churchland *et al.*, 2012; Lindahl *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2005). Approximately 30% of the plant net primary production is allocated to roots and soil (Beidler *et al.*, 2015) and is composed mainly of carbohydrates, amino acids and organic acids, fatty acids, low molecular mass aliphatic and aromatic acids, hormones and enzymes (Phillips *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016; Prescott and Grayston 2013).

To be able to take advantage of diverse C compounds, they must be decomposed by fungi and bacteria to mono- or disaccharides as that is a C form that can be transported across microbial cell wall (Burns and Dick 2002; de Vries *et al.*, 2012). The complex organic C compounds found in litter and soil decomposed by glycoside hydrolases (GHs) that cleave glycosidic linkages (e.g., those in cellulose and hemicellulose) and auxiliary activity enzymes (AAs) with redox activity. GH and AA both belong to carbohydrate-active enzymes (CAZymes) (Lombard *et al.*, 2014). CAZymes are classified into families by the similarity of their amino acid sequence and protein structures (Lombard *et al.*, 2014).

Fungi, most often Asco- and Basidiomycota, are well recognized decomposers of plant cell walls and they use diverse CAZymes in the process. Despite accumulating information, the knowledge of enzyme production in different ecophysiological and taxonomical groups of fungi is still limited. A few studies tried to predict the physiological traits of bacteria or fungi from genome sequencing data.

In fungal genome analyses, most attention was paid to the content of genes encoding ligninolytic enzymes and CAZymes in species with various ecophysiology, such as wood-associated white-rot (WR) and brown-rot (BR) fungi, mycorrhizal fungi, plant pathogens or others, or among phylogenetic ranks (Kohler *et al.*, 2015; Floudas *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Different fungal taxa encode various complex sets of extracellular enzymes in their genomes and the composition of these gene pools differs among taxa (Baldrian, 2008; Zhao *et al.*, 2013). The limited number of sequenced genomes, however, only allowed phylogeny-based comparisons on a coarse level of divisions, and these results seem to be affected by

various representations of individual ecophysiological groups among divisions (Zhao *et al.*, 2013).

Very abundant ecophysiological group of fungi in litter are litter decomposing cord-forming Basidiomycota (LDF) that are characterized by their saprotrophic lifestyle. LDF are similar to WR fungi in terms of the enzyme spectra they produce, such as ligninolytic oxidases and different peroxidases (Hatakka 2001; Martinez *et al.* 2005; Steffen *et al.* 2002). Another important ecological group of fungi are saprotrophic microfungi (SA), which are nonbasidiomycetous fungi often members of Ascomycota and Zygomycota. When compared to saprotrophic basidiomycetes, saprotrophic microfungi show similar cellulolytic activity and higher chitinase production (Baldrian *et al.*, 2011). Saprotrophic fungi can be also divided into ecological groups based on their metabolic capability to degrade lignin. White-rot basidiomycetes are distinguishable by cellulose-enriched white wood material left behind after degradation of lignin and hemicelluloses. They possess enzymes such as manganese peroxidase, versatile peroxidase and lignin peroxidase that help them to disrupt aromatic rings of lignin residues.-Brown-rot fungi, mostly Basidiomycota, grow most often on softwoods and modify lignin only partially, which results in a wood material brown in the appearance and consisting of oxidized lignin (Martinez *et al.* 2005). Lignin is oxidized by different mechanism than in white rotters, namely by Fenton's reactions (Baldrian and Valaskova 2008). The most important distinction of the brown-rot and white-rot fungi is the lack of ligninolytic class II peroxidases in brown-rot fungi (Riley *et al.*, 2014). Mycorrhizal fungi depend on their living host plant for C supply. In temperate and boreal forests more than 90% of trees participate in ectomycorrhizal symbiosis (ECM) (Markkola 1996).

Bacteria possess another important, although less explored, reservoir of plant cell wall-degrading enzymes (Berlemont and Martiny 2015) and contribute significantly to the decomposition of organic matter (Brown and Chang, 2014; Eichorst and Kuske, 2012; Lopez-Mondejar *et al.*, 2016; Stursova *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2013). Soil bacteria also contribute to the breakdown of phenolic compounds such as lignin, although their efficiency is typically much lower than that of fungi (Brown and Chang, 2014; Vetrovsky *et al.*, 2014). Cellulolytic bacteria can be found in all major phyla such as Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes (Berlemont *et al.*, 2014; Himmel *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2014; Koeck *et al.*, 2014; Lopez-Mondejar *et al.*, 2016; Sukharnikov *et al.*, 2011). Based on genome sequencing of bacteria, it was shown that some functional properties, such as the expression of chitin- or cellulose-degrading enzymes, demonstrates different levels of phylogenetic conservation (Berlemont and Martiny, 2013; Martiny *et al.*, 2013; Zimmerman *et al.*, 2013). Nevertheless, recent results supports the view that only genome analyses alone are not sufficient to predict enzyme production and need to be complemented by enzyme assays or substrate degradation tests.

The high abundance of Acidobacteria, Actinobacteria and Proteobacteria across forest soils (Kuffner *et al.*, 2012; Kurth *et al.*, 2013; Lipson 2007; Nacke *et al.*, 2011; Uroz *et al.*, 2013) seems to be the indication of their functional importance. The abundance of Acidobacteria is positively correlated with acidic pH and negatively with the C availability in soils, suggesting that they are slow-growing oligotrophs adapted to nutrient limitation (Garcia-Fraile *et al.*, 2016; Fierer *et al.*, 2007; Naether *et al.*, 2012). They are highly adaptable to environmental changes and have a high level of metabolic versatility allowing them to break down complex C substrates derived from SOM pool (Naether *et al.*, 2012; Rasche *et al.*, 2011).

Microbial communities in soil change their abundance and composition within seasons of the year and this is caused by the temperature and precipitation changes as well as seasonality in plant growth (Hogberg *et al.*, 2010; Kaiser *et al.*, 2010; Voriskova *et al.*, 2014). It was showed that saprotrophic fungi dominate in spring that correlates with spring fine root turnover (Satomura *et al.*, 2006), while ECM dominance in late summer (Davey *et al.*, 2012;

Jumpponen *et al.* 2010; Santalahti *et al.*, 2016; Voriskova *et al.*, 2014; Wallander *et al.*, 2001) is thought to be supported by maximal growth of spruce fine roots in summer (Stober *et al.*, 2000). Overall, we know from previous studies, that there are seasonal changes in abundance and also shifts in the microbial community composition. It is not known, however, whether similar changes in microbial community composition as observed in the litter of a deciduous forest (Lopez-Mondejar *et al.*, 2015; Voriskova *et al.*, 2014) also occur in coniferous forests. Although it was shown that summer microbial community was adapted to utilization of labile C sources such as root exudates (Dennis *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2009), there are indications that labile C may also prime decomposition of recalcitrant SOM (Kuzyakov 2010; Talbot *et al.*, 2008) as it is in the case of ECM fungi in their search for organic nitrogen (N) (Lindahl and Tunlid 2015). The activity of ECM fungi is suggested to inhibit decomposition processes of saprotrophic fungi by outcompeting them in the soil in summer by the process called “Gadgil” effect (Gadgil and Gadgil 1975). Thus we have suggested that in winter when ECM activity is much lower, decomposition processes by saprotrophic organisms should be more pronounced. In theory, decrease in the ratio of ECM to saprotrophic fungi in winter should be mirrored by the rise in the production of extracellular enzymes decomposing SOM.

## **Aims and Hypotheses**

The aim of my dissertation was uncovering the roles of fungi and bacteria in decomposition and describing the changes that microbial communities undergo through the year with an emphasis on the transcription of genes encoding enzymes. I have investigated whether it is fungal ecophysiology or taxonomy affiliation that have the major influence on variety of degradation enzymes produced at the same condition. I have examined the hypothesis that seasonality in rhizodeposition affects the composition of microbial communities as well as their usage of different C sources. The determination of the role of bacteria in decomposition of various C compound *in vitro* and their role in C cycle *in situ* of forest topsoil were another goal of my Ph.D. thesis. The usefulness of amplicon versus shot-gun sequencing and seasonality hypothesis as well was explored on single functional gene that is very abundant in both bacteria and fungi in the soil environment.

## **Methods**

In order to characterize ecophysiology of fungi and bacteria microorganisms were cultivated and their enzyme activities or their growth abilities on different substrates were measured. Enzyme activities were measured in environmental samples of soil and litter as well, and activity of microbial functional genes by metatranscriptomics was determined along. DNA and RNA libraries for sequencing were prepared in order to define, which functional genes are encoded in spruce forest floor microbiota, and which may be active in decomposition of diverse C compounds. Primers to amplify fungal  $\beta$ -glucosidase were designed and applied to DNA and RNA pool of the same microbial community as described by shot-gun sequencing of DNA/RNA pool of forest topsoil.

## **Results and Discussion**

Exploring the decomposition abilities of fungi, I have found that many enzymes were produced by wide range of them, such as phosphatases that are required for phosphorus acquisition,  $\beta$ -glucosidase cleaving disaccharides and oligosaccharides, and N-acetylglucosaminidases, which help to break down the chitin in fungal cell wall and aim in

growth and N recycling. The negative results were mostly found for “dispensable” enzyme activities, such as the production of specific hemicellulases and laccases.

Although our study was limited to 112 fungal strains and measurements of activity of 19 different enzymes, we have found that the presence and activity of the enzymes differed significantly among ecophysiological groups. The saprotrophic microfungi (SA) and BR fungi had certain enzyme production patterns that distinguished them between each other, as well as from the other ecological groups, while the patterns of enzyme activity in WR and LDF overlapped. In agreement with the higher impact of ecophysiology than taxonomy on encoded genes, genome and proteome analyses of the basidiomycetous order *Polyporales* showed that WR and BR taxa were different in the amount of encoded and produced glycosyl hydrolases, with higher share in WR (Hori *et al.*, 2013) that is consistent with what we have obtained for the BR and WR strains of *Polyporales*. The relationship between activity and encoded potential is not simple for many reasons and differences in phenotype are not explained just by genome content but regulation of the gene expression plays an important role too.

In another part of my dissertation I have explored degradation abilities of bacteria isolated from acidic spruce forest soil and litter. A total of 299 isolates were picked on pH 4.5 agar plates, among them Proteobacteria (66 %), Actinobacteria (17 %), and Acidobacteria (13 %) were the predominant phyla and also reflects the composition of acidic spruce soil as indicated by the previous results (Baldrian *et al.* 2012; Stursova *et al.* 2012).

Phosphomonoesterases,  $\beta$ -glucosidases and arylsulfatases were the most often produced enzymes among bacterial isolates. Although the use of enzyme activities as indicators of soil functionality is still a problem due to spatiotemporal variations in real environments and the difficulty to relate activity of individual enzymes and the rates of nutrient cycling processes (Nannipieri *et al.*, 2012; Uksa *et al.*, 2015), the production of  $\beta$ -glucosidases, cellobiohydrolases and N-acetylglucosaminidases at high rates by the acidobacterial strains and to lesser extent by Bacteroidetes, indicates their metabolic capability to degrade plant-derived oligosaccharides and chitin under acidic conditions. The study by Rawat *et al.* (2012) showed that the genomic machinery required for cellulose, hemicellulose and chitin degradation was found in all complete genomes of Acidobacteria. We suggest that subdivision 1 Acidobacteria are thus key players in the C cycle processes occurring in the coniferous soil environment and their genomic potential may be indeed realized as indicated by our study, which is in conflict with the description of Acidobacteria as “cheaters” by de Boer *et al.* (2005).

I have investigated decomposition abilities of bacteria and fungi *in situ* – in spruce forest soil and litter by so called “omics”. Early molecular studies did not differentiate between active and inactive microorganisms but a large proportion of the cells in a given environment are inactive at any one time (Bakken 1997), thus I have used metatranscriptomic approach to explore the effect of seasonal changes on the transcription of degradation enzymes in the active part of microbial community of the *Picea abies* topsoil.

I have discovered that 74% of functional genes were differentially expressed between litter and soil, with fungal transcripts dominating the litter and bacterial the soil. Broadly, community profiles of both soil DNA and RNA were largely consistent across seasons but seasonal changes in the activity of individual species, as well as of functional categories, were more pronounced in soil compared to litter. The winter saw the rise of RNA degradation, proteasome and lysosome-derived transcripts, which suggests reduced activity of microbial community in winter and recycling of the biomass. In summer on the other hand, more transcribed genes were involved in signaling or metabolism, suggesting high activity of the microbial community. The most pronounced differences between seasons in the production of transcripts were recorded in soil, where 33.4% of fungal genes (60% of ECM fungi) were overexpressed in summer, while only 15.7% (15% of ECM fungi) in winter.

The seasonality of root processes, such as C limitation in the winter due to restricted photosynthesis and the higher availability of simple C in summer, can explain the seasonality in transcription of fungi, which were reported to be more abundant in the rhizosphere than in bulk soils (Turner *et al.*, 2013).

I was exploring further how seasonality affects enzymes involved in C cycle (CAZymes). Another important question was, how big is the share of CAZy transcripts produced by bacteria and by fungi, thus I have focused on comparing the metagenome-encoded and transcribed activity of CAZymes of both in the *Picea abies* forest floor.

The size and composition of the environmental metagenome gene pool is often regarded to indicate its functioning (Fierer *et al.*, 2012) despite the fact that the links between genome content and expression were found to be weak in individual bacteria and fungi (Lopez-Mondejar *et al.*, 2016; this thesis). We have found more bacterial reads in the metagenome than in the metatranscriptome and no clear relationship between gene abundance in the metagenome and its transcription. The higher ratio of bacterial CAZymes to fungal in the metagenome is 2.5:1 can be caused by better annotation of bacterial genes that do not contain introns. The same ratio in the metatranscriptome was 1:1.9 in favor of fungi. The share of fungal transcripts in this study was much higher than in metatranscriptomic studies from a maple forest or peatlands, where bacterial CAZymes were 2.6 to 5-fold more abundant (Hesse *et al.*, 2015; Ivanova *et al.*, 2016), indicating importance of fungi in the coniferous forest. High share of fungal CAZymes is in line with the results of beech litter proteomic analysis, where fungal proteins also dominated (Schneider *et al.*, 2012). Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria were the most important bacterial producers of CAZymes in the study as well as in acidic boreal peatland (Ivanova *et al.*, 2016).

I have found that most bacteria used labile substrates such as starch, cellobiose or other oligosaccharides but they were also important producers of chitinolytic enzymes, confirming their role in turnover of dead fungal biomass (Brabcova *et al.*, 2016). The decomposition of lignin, cellulose, and xylan was dominated by fungi that appeared to be adapted to decompose recalcitrant plant-derived biomass (van der Wal *et al.*, 2013).

The relative contribution to CAZyme expression increased for bacteria (such as Acidobacteria) and Ascomycota in winter in soil at the expense of Basidiomycota (probably ECM fungi). This may indicate the relief of inhibition of non-mycorrhizal microorganisms due to the Gadgil effect (Fernandez and Kennedy 2016), or simply the decrease of activity of ECM fungi. The fact that the use of reserve compounds (glycogen/starch and trehalose) increased in winter samples indicates that biomass needs to be maintained at the expense of metabolic reserves. The use of trehalose and mannitol as energy reserves by ECM during winter starvation was already observed (Druebert *et al.*, 2009; Nehls 2008). Contrary to our expectation, microbial communities in soil did not switch from the utilization of simple C compounds in summer to complex carbohydrates in winter and enzymes degrading lignin, cellulose and xylan were higher in summer, pointing towards the “priming” effect of simple C in decomposition of recalcitrant C by fungi.

After I have investigated the abilities microbes to degrade C compounds *in vitro* and *in situ*, I was curious whether a single abundant gene of  $\beta$ -glucosidase can be used as a proxy of microbial processes.

The transcript pool of  $\beta$ -glucosidase amplicons was typically less diverse than the gene pool, suggesting that just a part of the microbial community was metabolically active. Because most of the analyzed fungi and bacteria harbor more than one  $\beta$ -glucosidase gene (Lopez Mondejar *et al.*, 2016), the diversity of the taxa possessing these genes in forest topsoil can be estimated only roughly.

Of the predicted GH1 fungal genes, 16-30% were transcribed, while for GH3 it was 23-69 %. Fungal  $\beta$ -glucosidase genes from the GH1 family were assigned to Ascomycota and of GH3



to Ascomycota and Basidiomycota as well. Basidiomycota transcripts of GH1 were 1.5x more abundant than that of Ascomycota when focused on  $\beta$ -glucosidase in metatranscriptome, while in case of GH3 the transcripts of Basidiomycota and Ascomycota had the similar abundances.

Of bacterial GH1  $\beta$ -glucosidase 40-63% were transcribed and in case of GH3 it was 19-52%. Among bacteria, Actinobacteria and Proteobacteria contributed to most  $\beta$ -glucosidase sequences of the GH1 family, while in the GH3 family the most sequences belonged to Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Acidobacteria. Berlemont and Martiny (2013) reported that  $\beta$ -glucosidase and cellulase genes are present in nearly all bacterial phyla, thus they are ubiquitous in the environment.

The results showed distinct distribution of most abundant  $\beta$ -glucosidase gene transcripts from microbial community between both horizons in different seasons for both, GH1 and GH3 families with season more influencing transcription of GH3  $\beta$ -glucosidase genes.

Seasons did not have any effect on  $\beta$ -glucosidase enzyme activity, which points at the limitations of the metatranscriptome analysis and suggests that the analysis of metaproteome may be needed. The results also show that the whole diversity of a single functional gene such as  $\beta$ -glucosidase cannot be captured by amplicon sequencing since it is always biased by primer design and shotgun sequencing is irreplaceable in this respect.

## Conclusions

In my Ph.D. thesis, I have confirmed the hypothesis that the decomposition traits of saprotrophic fungi are shaped by the combination of their ecophysiology and taxonomy, with ecophysiology being more important. When focused on the role of bacteria isolated from the forest floor in degradation of C compounds, Proteobacteria showed the widest spectrum of C source utilization among the strains but members of the Acidobacteria (Subdivision 1) were proved to be abundant in acidic spruce forest soil and active in organic matter decomposition. The inconsistency of genome information and activity measurements pinpoints the importance of the often neglected functional screening of fungi and bacteria, which is necessary for the reliable evaluation of their physiological capabilities.

The hypothesis about plant photosynthetic production as the major driver of seasonality in soil was confirmed, as the contribution of Basidiomycota (most often represented by ECM fungi in the environment) to total microbial transcription decreases in winter. On the other hand, the microbial community composition on the DNA level was quite stable and profound changes were found in microbial transcription across seasons. The transcriptomic data of functional enzymes (CAZymes) involved in various C compounds degradation suggest the “priming” effect of rhizodeposited simple C on decomposition of recalcitrant C forms by microbes in summer. While the use of reserve compounds such as starch or trehalose is high in winter, summer is characterized by high expression of ligninolytic, cellulolytic and xylanolytic enzymes that are involved in degradation of complex C substrate.

A fact that fungi do decompose more recalcitrant substrate is in line with occurrence of such a substrate in litter where fungi strongly dominated in transcription, while in soil bacteria and fungi contribute equally to transcription.

The results confirmed that microbial  $\beta$ -glucosidase producers are horizon specific and there are differences in  $\beta$ -glucosidase transcription among horizons and seasons. Comparing the results of shot-gun and amplicon sequencing, higher diversity and abundance was found in metatranscriptome/metagenome than in amplicon study using primers biased towards species in databases.

## Publications used to obtain Ph.D. degree:

**Žifčáková, L.,** Větrovský, T., Lombard V., Henrissat, B., Howe, A., Baldrian, P. (2017): Feed in summer, rest in winter: Microbial C utilization in forest topsoil. *Microbiome – submitted* (IF = 9)

Pathan, S. I., **Žifčáková, L.,** Ceccherini, M. T., Pantani, O. L., Větrovský, T., Baldrian, P. (2017): Seasonal variation and distribution of total and active microbial community of  $\beta$ -glucosidase encoding genes in coniferous forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 105:71-80 (IF = 4.152)

**Žifčáková, L.,** Větrovský, T., Howe, A., Baldrian, P. (2016): Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental Microbiology* 18: 288-301 (IF = 5.932)

Lladó, S., **Žifčáková, L.,** Větrovský, T., Eichlerová, I., Baldrian, P. (2016): Functional screening of abundant bacteria from acidic forest soil indicates the metabolic potential of acidobacteria subdivision 1 for polysaccharide decomposition. *Biology and Fertility of Soils* 52: 251-260 (IF = 3.069)

Eichlerová, I., Homolka, L., **Žifčáková, L.,** Lisá, L., Dobiášová, P., Baldrian, P. (2015): Enzymatic systems involved in decomposition reflects the ecology and taxonomy of saprotrophic fungi. *Fungal Ecology* 13: 10-22 (IF = 2.631)

## **Lucia Žifčáková – Curriculum vitae**

### **Education**

**Ph.D., Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic**      **2012 – 2017**  
Specialization: Microbiology

Doctoral thesis: Molecular biology and ecology of microbial decomposition of plant-derived biopolymers in forest ecosystems (supervisor Dr. Petr Baldrian)

**M.Sc., Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic**      **2009 – 2012**  
Specialization: Cell and molecular biology of microbial populations

Master thesis: Characterization of fungal community decomposing litter in the coniferous forests of the Šumava National Park (supervisor Dr. Petr Baldrian)

**B.Sc., Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic**      **2006 -2009**  
Specialization: Molecular biology and biochemistry of organisms

### **Research experience**

**Academy of Sciences of the Czech Republic – Prague, Czech Republic**      **2009 – 2017**  
Institute of Microbiology, v.v.i., Laboratory of Environmental Microbiology  
MSc. student and part-time since October 2009 and Phd. student, full time since 2013  
Research advisor: Dr. Petr Baldrian

**INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) – Nancy, France**      **2015**  
Lab of Excellence for Advanced Research on the Biology of FoRest Ecosystems (ARBRE)  
Short stay with focus on bioinformatics processing of transcriptomic data  
Research advisor: Dr. Annegret Kohler and Dr.Francis Martin

### **Courses**

Next Generation Sequencing at the Poles – processing of 454-pyrosequencing data by programs like Mothur, Qiime and ApliconNoise.

### **Scientific interests**

Structure and function of microbial communities in soils with an emphasis on fungal community transcriptomics. Biodiversity analysis of microbial communities in different soil environments. Analysis of functional genes involved in soil organic matter transformation and mainly in cellulose decomposition on metagenomic and metatranscriptomic level. Seasonal patterns in transcription of functional genes involved in carbon and nitrogen cycling in forest soil.

### **Fellowships and grants**

#### **Grant from the Grant Agency of the Charles University, Prague 2014 - 2016**

The importance of the GH61 polysaccharide monooxygenase for cellulose decomposition by fungi in the forest soil  
Principal investigator

#### **Grant from the Grant Agency of the Charles University, Prague 2015 - 2016**

Comparison of ITS nrDNA and alternative markers for fungal metabarcoding in environmental samples  
Principal investigator

#### **FEMS Congress Grant for Young Scientists 2011**

The 4th International Conference on Polar and Alpine Microbiology  
Ljubljana, Slovenia

### **Awards**

The best publication on the Institute of Microbiology, ASCR, Prague in year 2013  
The best diploma thesis on Institute of Microbiology, ASCR, Prague in year 2013

### **Other papers in journals**

Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., Baldrian, P. (2016): The rpb2 gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular ecology resources* 16: 388-401

Žifčáková, L., Baldrian, P. (2012): Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. *Fungal Ecology* 5: 481-489

Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M.B., Burgess, R., Baldrian, P. (2012): Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 735-746

Baldrian, P., Kolařík, M., Štursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Žifčáková, L., Šnajdr, J., Rídl, J., Vlček, Č., Voříšková, J. (2012): Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME Journal* 6: 248-258

Žifčáková, L., Dobiášová, P., Kolářová, Z., Koukol, O., Baldrian, P. (2011): Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles. *Fungal Ecology* 4: 427-436

## **Selected abstracts of papers presented at conferences**

**Žifčáková L.**, Větrovský T., Henrissat B., Lombard V., Baldrian P.: The role of bacteria and fungi in decomposition processes in the forest topsoil across the seasons. International Society for Environmental Microbiology 16, Montreal, August 21-26, 2016, Book of Abstracts.

**Žifčáková L.**, Větrovský T., Eichlerová, I., Dobiášová P., Navrátilová D., Baldrian P.: Is there a correlation of lignocellulolytic genes expression and their activity in ME fungal cultures?, Ecology of soil Microorganisms 2015, Prague 29.11. – 3.12.2015, Book of abstracts

**Žifčáková L.**, Větrovský T., Baldrian P.: Seasonal changes in the functioning of fungal community in the coniferous forest soil and litter, the 10th International Mycological Congress, Bangkok, August 3-8, 2014, Book of Abstracts

Baldrian P., Voříšková J., Štursová M., Valášková V., Větrovský T., **Žifčáková L.**, Šnajdr J., Kolařík M.: Identification of active fungal and bacterial soil community members based on DNA/RNA analysis and <sup>13</sup>C-SIP combined with Titanium pyrosequencing 2nd Annual Argonne Soil Workshop, Argonne, October 6-8, 2010, Book of Abstracts

## **Oral presentation at conferences**

**Žifčáková L.**, Větrovský T., Henrissat B., Lombard V., Baldrian P.: The comparison of encoded and active genes for organic matter decomposition in microbial community of the spruce forest topsoil by shot-gun sequencing., 27th Congress of the Czechoslovak Society for Microbiology, Prague, September 7-9, 2016, Book of Abstracts.

**Žifčáková L.**, Větrovský T., Beranová, Voříšková J., Baldrian P.: Spatial and seasonal structure of the communities of total and cellulolytic fungi in the mountainous spruce forest, International Society for Environmental Microbiology 14, Copenhagen, August 19-25, 2012, Book of Abstracts.

## **References**

Bakken LR, 1997. Culturable and non-culturable bacteria in soil. van Elsas JD, Trevor JT, Wellington EMH, Eds. Modern soil microbiology. *Marcel Dekker* New York pp 47–61.

Baldrian P, and Valaskova V, 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:501-521.

Baldrian P, Kolarik M, Stursova M, Kopecky J, Valaskova V, Vetrovsky T, Zifcakova L, Snajdr J, Ridl J, Vlcek C, Voriskova J, 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *Isme Journal* 6:248-258.

Baldrian P, Snajdr J, 2011. Lignocellulose-Degrading Enzymes in Soils. *Soil Enzymology* 22:167-186.

Baldrian P, Valaskova V, 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:501-521.

Beidler KV, Taylor BN, Strand AE, Cooper ER, Schonholz M, Pritchard SG, 2015. Changes in root architecture under elevated concentrations of CO<sub>2</sub> and nitrogen reflect alternate soil exploration strategies. *New Phytol.* 205:1153-1163.

Berlemont R, and Martiny AC, 2013. Phylogenetic Distribution of Potential Cellulases in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 79:1545-1554.

Berlemont R, Martiny AC, 2015. Genomic Potential for Polysaccharide Deconstruction in Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 81:1513-1519.

- Brabcova V, Novakova M, Davidova 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(4):1369-1381.
- Brown ME, Chang MC, 2014. Exploring bacterial lignin degradation. *Current opinion in chemical biology* 19:1-7.
- Burns RG, Dick RP, 2002. Enzymes in the Environment: Activity Ecology and Applications. *Marcel Dekker*, New York.
- Churchland C, Weatherall A, Briones MJI, Grayston SJ, 2012. Stable-isotope labeling and probing of recent photosynthates into respired CO<sub>2</sub> soil microbes and soil mesofauna using a xylem and phloem stem-injection technique on Sitka spruce *Picea sitchensis*. *Rapid. Comm. Mass. Spec.* 26:2493–2501.
- Clemmensen KE, Bahr A, Ovaskainen O, Dahlberg A, Ekblad A, Wallander H, Stenlid J, Finlay RD, Wardle DA, Lindahl BD, 2013. Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* 339:1615-1618.
- Davey M, Heegaard LE, Halvorsen R, Ohlson M, Kauserud H, 2012. Seasonal trends in the biomass and structure of bryophyte-associated fungal communities explored by 454 pyrosequencing. *New Phytologist* 195:844-856.
- de Boer W, Folman LB, Summerbell RC, Boddy L, 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS microbiology reviews* 29(4):795-811.
- de Vries RP, Nayak V, van den Brink J, Vivas Duarte AD, Stalbrand H, 2012. Fungal degradation of plant oligo- and polysaccharides. In: Grunwald P. editor, Carbohydrate modifying biocatalysts. *Pan Stanford Publishing Pte Ltd Singapore* pp 693–759.
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR, 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72(3):313-327.
- Druebert C, Lang C, Valtanen K, Polle A, 2009. Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. *Plant cell & environment* 32(8):992-1003.
- Eichorst SA, Kuske C R, 2012. Identification of cellulose-responsive bacterial and fungal communities in geographically and edaphically different soils by using stable isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2316-2327.
- Fernandez CW, Kennedy PG, 2016. Revisiting the 'gadgil effect': do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? *New phytologist* 209(4):1382-1394.
- Fierer N, Leff JW, Adams BJ, Nielsen UN, Bates ST, Lauber CL, Owens S, Gilbert JA, Wall DH, Caporaso JG, 2012. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:21390-21395.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martinez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Gorecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kues U, Kumar TKA, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Duenas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS, 2012. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336 (6089): 1715-1719.
- Gadgil RL, Gadgil PD, 1975. Suppression of litter decomposition by mycorrhizal roots of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forest Science* 5:33–41.
- Garcia-Fraile P, Benada O, Cajthaml T, Baldrian P, Llado S, 2016. *Terracidiphilus gabretensis* gen nov sp an abundant and active forest soil acidobacterium important in organic matter transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:560–569.
- Hatakka A, 2001. Biodegradation of lignin, In: Biopolymer, Biology Chemistry Biotechnology Applications Vol 1. Lignin Humic Substances and Coal. Hofrichter M, and Steinbuechel A, eds *Wiley-WCH* 129-180.
- Hesse CN, Mueller RC, Vuysich M, Gallegos-Graves L, Gleasner CD, Zak DR, Kuskel CR, 2015. Forest floor community metatranscriptomes identify fungal and bacterial responses to N deposition in two maple forests. *Frontiers in Microbiology* 6.

- Himmel ME, Xu Q, Luo Y, Ding SY, Lamed R, Bayer EA, 2010. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels* 1:323–341.
- Hogberg MN, Briones MJJ, Keel SG, Metcalfe DB, Campbell C, Midwood AJ, Thornton B, Hurry V, Linder S, Nasholm T, Hogberg P, 2010. Quantification of effects of season and nitrogen supply on tree below-ground carbon transfer to ectomycorrhizal fungi and other soil organisms in a boreal pine forest. *New Phytologist* 187:485-493.
- Hori C, Gaskell J, Igarashi K, Samejima M, Hibbett D, Henrissat B Cullen D, 2013. Genome-wide analysis of polysaccharides degrading enzymes in 11 white- and brown-rot polyporales provides insight into mechanisms of wood decay. *Mycologia* 105(6):1412-1427.
- Ivanova AA, Wegner CE, Kim Y, Liesack W, Dedysh SN, 2016. Identification of microbial populations driving biopolymer degradation in acidic peatlands by metatranscriptomic analysis. *Molecular Ecology* 25(19):4818-35.
- Jimenez D, Dini-Andreote JF, van Elsas JD, 2014. Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnology for Biofuels* 7.
- Jones RT, Robeson MS, Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N, 2009. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME J* 3:442-453.
- Jumpponen A, Jones KL, Mattox D, Yaeger C, 2010. Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus spp.* ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology* 19:41-53.
- Kaiser C, Frank A, Wild B, Koranda M, Richter A, 2010. Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 omega 6,9 and 18:1 omega 9. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1650-1652.
- Koeck DE, Pechtl A, Zverlov VV, Schwarz WH, 2014. Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 29:171-183.
- Kohler A, Kuo A, Nagy LG, Morin E, Barry KW, Buscot F, Canback B, Choi C, Cichocki N, Clum A, Colpaert J, Copeland A, Costa MD, Dore J, Floudas D, Gay G, Girlanda M, Henrissat B, Herrmann S, Hess J, Hogberg N, Johansson T, Khouja HR, LaButti K, Lahrman U, Levasseur A, Lindquist EA, Lipzen A, Marmeisse R, Martino E, Murat C, Ngan CY, Nehls U, Plett JM, Pringle A, Ohm RA, Perotto S, Peter M, Riley R, Rineau F, Ruytinx J, Salamov A, Shah F, Sun H, Tarkka M, Tritt A, Veneault-Fourrey C, Zuccaro A, C Mycorrhizal Genomics Initiative, Tunlid A, Grigoriev IV, Hibbett DS, Martin F, 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat. Genet.* 47:410-415.
- Kuffner M, Hai B, Rattei T, Melodelima C, Schloter M, Zechmeister-Boltenstern S, Jandl R, Schindlbacher A, Sessitsch A, 2012. Effects of season and experimental warming on the bacterial community in a temperate mountain forest soil assessed by 16S rRNA gene pyrosequencing. *Fems Microbiology Ecology* 82:551-562.
- Kurth F, Zeitler K, Feldhahn L, Neu TR, Weber T, Kristufek V, Wubet T, Herrmann S, Buscot F, Tarkka M, 2013. Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC Microbiol.* 13:205.
- Kuzyakov Y, 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1363-1371.
- Lindahl B, Ihrmark DK, Boberg J, Trumbore SE, Hogberg, P Stenlid J, Finlay RD, 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytol.* 173:611-620.
- Lipson DA 2007. Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. *Fems Microbiology Ecology* 59:418-427.
- Lombard V, Golaconda H, Ramulu E, Drula P, Coutinho M, Henrissat B, 2014. The carbohydrate-active enzymes database CAZy in 2013. *Nucleic Acids Research* 42:490-495.
- Lopez-Mondejar R, Voriskova J, Vetrovsky T, Baldrian P, 2015. The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biol. Biochem.* 87:43-50.
- Markkola AM, 1996. Resource allocation in ectomycorrhizal symbiosis in scots pine affected by environmental changes. *University of Oulu Finland* 43pp
- Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez MJ, Gutiérrez A, del Rio JC, 2005. Biodegradation of lignocelluloses: microbial chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 8(3):195-204.

- Martiny AC, Vrugt JA, Primeau FW, Lomas MW, 2013. Regional variation in the particulate organic carbon to nitrogen ratio in the surface ocean. *Global Biogeochem Cycles* 27(3):723-731.
- Nacke H, Will C, Herzog S, Nowka B, Engelhaupt M, Daniel R, 2011. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *Fems Microbiology Ecology* 78:188-201.
- Naether A, Foessel BU, Naegele V, Wust PK, Weinert J, Bonkowski M, Alt F, Oelmann Y, Polle A, Lohaus G, Gockel S, Hemp A, Kalko EK, Linsenmair KE, Pfeiffer S, Renner S, Schoning I, Weisser WW, Wells K, Fischer M, Overmann J, Friedrich MW, 2012. Environmental factors affect Acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7398-7406.
- Nannipieri P, Giagnoni L, Renella G, Puglisi E, Ceccanti B, Masciandaro G, Fornasier F, Moscatelli MC, Marinari S, 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biology and Fertility of Soils* 48:743-762.
- Nehls U, Gohringer F, Wittulsky S, Dietz S, 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol. Stuttg* 12:292-301.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R, 2005. Fungal community analysis by largescale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9):5544-5550.
- Phillips RP Finzi AC, Bernhardt ES, 2011. Enhanced root exudation induces microbial feedbacks to N cycling in a pine forest under long-term CO<sub>2</sub> fumigation, *Ecol. Lett.* 14:187-194.
- 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.
- Rasche F, Knapp D, Kaise C r, Koranda M, Kitzler B, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A, Sessitsch A, 2011. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *Isme Journal* 5:389-402.
- Rawat SR, Mannisto MK, Bromberg Y, Haggblom MM, 2012. Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of Acidobacteria in organic carbon utilization in Arctic tundra soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 82(2):341-355.
- Riley R, Salamov AA, Brown D W, Nagy LG, Floudas D, Held BW, Levasseur A, Lombard V, Morin E, Otilar R, Lindquist EA, Sun H, LaButti KM, Schmutz J, Jabbour D, Luo H, Baker SE, Pisabarro AG, Walton JD, Blanchette RA, Henrissat B, Martin F, Cullen D, Hibbett DS, Grigoriev IV, 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(27):9923-9928.
- Santalaihti M, Sun H, Jumpponen A, Pennanen T Heinonsalo J, Baldrian P, 2016. Vertical and seasonal dynamics of fungal communities in boreal Scots pine forest soil. *Fems Microbiology Ecology* 92:170.
- Satomura T, Hashimoto Y, Koizumi H, Nakane K, Horikoshi T, 2006. Seasonal patterns of fine root demography in a cool-temperate deciduous forest in central Japan. *Ecological Research* 21:741-753.
- Schneider T, Keiblinger KM, Schmid E, Sterflinger-Gleixner K, Ellersdorfer G, Roschitzki B, Richter A, Eberl L, Zechmeister-Boltenstern S, Riedel K, 2012. Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *Isme Journal* 6:1749-1762.
- Snajdr J, Valaskova V, Merhautova V Herinkova J, Cajthaml T, Baldrian P, 2008. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2068-2075.
- Stober C, George E, Persson H, 2000. Root growth and response to nitrogen In: Schulze ED ed Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems. *Springer Berlin* pp 99-121.
- Stursova M, Zifcakova L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P, 2012. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *Fems Microbiology Ecology* 80:735-746.
- Sukharnikov L, Cantwell OBJ, Podar M, Zhulin IB, 2011. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology* 29:473-479.
- Talbot JM, Allison SD, Treseder KK, 2008. Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional Ecology* 22:955-963.

- Tian J, Lu S, Fan M, Li X, Kuzyakov Y, 2013. Labile soil organic matter fractions as influenced by non-flooded mulching cultivation and cropping season in rice–wheat rotation. *European Journal of Soil Biology* 56:19-25.
- Trivedi P, Anderson IC, Singh BK, 2013. Microbial modulators of soil carbon storage: integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends in microbiology* 21(12):641-651.
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, Heavens D, Alston M, Swarbreck D, Osbourn A, Grant A, Poole PS, 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME journal* 7(12):2248-2258.
- Uksa M, Schloter M, Endesfelder D, Kublik S, Engel M, Kautz T, Kopke U, Fischer D, 2015. Prokaryotes in Subsoil-Evidence for a strong spatial separation of different phyla by analysing co-occurrence networks. *Frontiers in microbiology* 6.
- van der Wal A, Geydan TD, Kuyper TW, de Boer W, 2013. A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 37:477-494.
- Van Dyk JS, Pletschke BI, 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 306:1458-1480.
- Vetrovsky T, Steffen KT, Baldrian P, 2014. Potential of Cometary Transformation of Polysaccharides and Lignin in Lignocellulose by Soil Actinobacteria. *PLOS ONE*. 9(2):e89108+.
- Voriskova J, Brabcova V, Cajthaml T, Baldrian P, 2014. Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist* 201:269-278.
- Wallander H, Nilsson LO, Hagerberg D, Baath E, 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist* 151:753-760.
- Wang F, Shi N, Jiang R, Zhang F, Feng G, 2016. In Situ Stable Isotope Probing of Phosphate-Solubilizing Bacteria in the Hyphosphere. *Journal of Experimental Botany* 67.6: 1689–1701.
- Zhao S, Sun SJB, Cui XY, 2013. Profile distribution and seasonal dynamics of water-extractable carbohydrate in soils under mixed broad-leaved Korean pine forest on Changbai Mountain. *Journal of Forestry Research* 24:509-514.
- Zimmerman AE, Martiny AC, Allison SD, 2013. Micro-diversity of extracellular enzyme genes among sequenced prokaryotic genomes. *ISME J.* 7:1187–1199.