

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**



Autoreferát disertační práce

**Molekulární biologie půdních hub, podílejících se na rozkladu  
opadu v lesních ekosystémech**

**Mgr. Jana Voříšková**

Praha, 2013

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště: Laboratoř environmentální mikrobiologie,  
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Jana Voříšková

Školitel: RNDr. Petr Baldrian, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

# Obsah

<b>ABSTRAKT</b>	<b>4</b>
<b>ÚVOD</b>	<b>5</b>
<b>HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE</b>	<b>6</b>
<b>MATERIÁL A METODIKA</b>	<b>8</b>
<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>8</b>
<b>ZÁVĚRY</b>	<b>10</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>22</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>26</b>
<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b>	<b>30</b>

# Content

<b>ABSTRACT</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>HYPOTHESIS AND AIMS</b>	<b>17</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b>	<b>18</b>
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>21</b>
<b>REFERENCE LIST</b>	<b>22</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>26</b>
<b>LIST OF PUBLICATIONS</b>	<b>30</b>

## Abstrakt

V lesních ekosystémech vstupuje významná část uhlíku do půdy ve formě rostlinného opadu. Dekompozice opadu a půdní organické hmoty je proto důležitým procesem ovlivňujícím bilanci živin a toky uhlíku v půdě. Houby jsou v terestrických ekosystémech pokládány za nejvýznamnější rozkladače a to díky své schopnosti produkovat řadu extracelulárních enzymů, které jim umožňují rozkládat biopolymery. I když houby zastávají klíčovou roli v procesu dekompozice, jen málo je známo o struktuře a diverzitě jejich společenstev a jejich přesná funkce v lesních půdách zůstává mnohdy nejasná.

Tato disertační práce byla zaměřena na charakterizaci houbových společenstev v lesních půdách a jejich schopností týkajících se dekompozice rostlinného opadu. Součástí této práce bylo vypracovat metodiku pro podrobnou analýzu komplexních mikrobiálních společenstev a využít ji pro analýzu environmentálních vzorků. Dále se podařilo kvantifikovat diverzitu genu pro exocelulázu v půdním vzorku.

Výsledky této práce ukázaly, že struktura mikrobiálního společenstva se liší mezi horizonty lesního půdního profilu. Významné rozdíly ve složení společenstva byly pozorovány mezi DNA a RNA komunitou navzdory jejich podobné diverzitě. Několik mikrobiálních taxonů vysoce abundantních v RNA vykazovalo jen velmi nízkou abundanci v DNA, což indikuje, že tyto druhy přes svoji nízkou početnost významně přispívají k dekompozičním procesům v půdách. Během dekompozice rostlinného opadu dochází k rychlým sukcesním změnám společenstva hub, přičemž většina abundantních druhů v substrátu dominuje pouze dočasně. Aktivita, množství biomasy a diverzita hub výrazně klesá s hloubkou půdy. Složení houbových společenstev v lesní půdě je výrazně ovlivněno sezónními vlivy, což je nejvíce patrné v nejsvrchnějším opadovém horizontu. V opadovém horizontu dosahují saprotrofní rody svého sezónního maxima na podzim, zatímco pro léto je typický nejvyšší výskyt ektomykorhizních hub. Minerální půdní horizont vykazuje významné sezónní změny v množství houbové biomasy. Houby izolované z lesní půdy se navzájem lišily schopností rozkládat půdní biopolymery. Houby nepatřící mezi saprotrofní basidiomycety pravděpodobně nehrají důležitou roli v rozkladu ligninu, ale jsou schopny produkovat řadu celulolytických a chitinolytických enzymů, což je předurčuje k aktivní roli při rozkladu lignocelulózy nebo mrtvé houbové biomasy. Při studiu vlivu chemického složení opadu na rychlost jeho degradace, bylo ukázáno, že rychlost dekompozice stoupá s obsahem dusíku v opadu, zatímco obsah ligninu nemá vliv ani na úbytek hmotnosti, ani na aktivitu

ligninolytických enzymů. Tento výsledek naznačuje, že aktivita ligninolytických enzymů je pravděpodobně méně vhodným indikátorem dekompozice ligninu než se předpokládalo.

## Úvod

Temperátní lesy patří mezi hlavní biomy na planetě a pokrývají plochu o rozloze 570 miliónů ha (FAO and JRC, 2012). V lesních ekosystémech významná část uhlíku vstupuje do půdy ve formě rostlinného opadu (Berg and McLaugherty, 2003). Pro stromy opadavého lesa je typické sezónní opadání listů, ke kterému dochází na podzim a má za následek nahromadění čerstvého opadu s lehce dostupnými živinami (Šnajdr et al., 2011). V důsledku přísunu opadu a jeho mikrobiální transformace je možné v lesních půdách rozeznat tři hlavní horizonty půdního profilu: opadový horizont obsahující výhradně organickou hmotu z mrtvé rostlinné biomasy (L), organický (humusový) horizont představující směs rostlinné organické hmoty a půdních složek (H) a minerální horizont s nízkým obsahem organické hmoty (Ah).

Rostlinný opad se skládá z několika skupin organických látek. Mezi nejběžnější složky rostlinného opadu patří celulóza, hemicelulóza a lignin. Rozklad rostlinného opadu je hlavní cestou pro návrat živin do půdy (Berg et al., 2001) a jsou za něj zodpovědni převážně houby, bakterie a bezobratlí živočichové (Hattenschwiler et al., 2005). V temperátních lesích hrají houby hlavní roli v tomto procesu a zvláště saprotrofní basidiomycety jsou považovány za nejdůležitější skupinu mikroorganismů podílející se na chemické přeměně jednotlivých složek opadu (Baldrian, 2008).

Houby jsou schopny produkovat řadu extracelulárních enzymů, které jim umožňují degradovat lignocelulózu. Houbové hydrolytické enzymy pro degradaci celulózy zahrnují endo-1,4- $\beta$ -glukanázu, celobiohydrolázu a 1,4- $\beta$ -glukosidázu (Baldrian and Valášková, 2008) a enzymy pro degradaci ligninu se skládají z oxidáz, peroxidáz a enzymů produkující peroxid vodíku. Aktivita extracelulárních enzymů měřená v environmentálních vzorcích se často používá jako ukazatel aktivity mikrobiálních společenstev. Nicméně není možné tuto naměřenou aktivitu přímo vztahovat k určitému mikrobiálnímu druhu. Několik současných prací ukázalo, že je možné v environmentálních vzorcích identifikovat geny a transkripty kódující lakázu, peroxidázy, celulolytické a další hydrolytické a oxidativní enzymy (Bodeker et al., 2009; Damon et al., 2012; Edwards et al., 2008; Kellner and Vandenbol, 2010; Luis et al., 2004; Uroz et al., 2013). Například Edwards et al. (2008) zkoumali v lesní půdě diverzitu genů kódující celobiohydrolázu (*cbhI*), což je enzym, určující rychlost rozkladu celulózy.

Rozklad opadu je postupný proces, ve kterém zpočátku dochází k dekompozici méně rezistentních složek a později k rozkladu zbylých vysoce rekalcitrančních sloučenin jako je například lignin. V průběhu rozkladu opadu dochází ke změnám v jeho složení, což má za následek změnu mikrobiálních společenstev žijících na opadu (Dilly et al., 2001), protože pro úplný rozklad opadu jsou postupně potřebné různé katabolické schopnosti mikroorganismů (Frankland, 1998; Osono, 2006). V lesní půdě se dostupnost živin výrazně liší v závislosti na půdním horizontu (Šnajdr et al., 2008) a charakteristickou vlastností lesních půd je tedy vertikální stratifikace. Vertikální rozložení houbových společenstev v boreálních a temperátních lesech bylo dobře popsáno ve studiích Lindahl et al. (2007) a O'Brien et al. (2005), kteří ukázali výrazné prostorové oddělení saprotrofních a mykorrhizních hub v půdním profilu. Pozorování z různých lesních půd naznačují, že environmentální faktory jako je teplota, dostupnost vody a vlastnosti substrátu mohou výrazně ovlivňovat složení mikrobiálních společenstev (Aponte et al., 2010; Kaiser et al., 2010; Kuffner et al., 2012; Landesman and Dighton, 2011). Sezónní změna intenzity a rychlosti fotosyntetické aktivity stromů má za následek sezónalitu toku fotosyntátů do lesní půdy a tedy změnu jejich dostupnosti pro mikroorganismy (Högberg et al., 2010; Kaiser et al., 2010).

Chemické složení listí a potažmo opadu se liší mezi jednotlivých druhů rostlin a je známo, že má vliv na rychlost jeho rozkladu (Hattenschwiler and Gasser, 2005). Pro zjištění vlivu chemického složení opadu na rychlost rozkladu bez vlivu sukcesních změn v mikrobiálním společenstvu, se několik studií zaměřilo na rozklad opadu pomocí jednoho houbového druhu za definovaných laboratorních podmínek (Osono and Takeda, 2002, 2006; Steffen et al., 2007). Nicméně bližší informace týkající se vlivu složení opadu na rychlost jeho rozkladu jsou výrazně omezené.

## **Hypotézy a cíle práce**

Moje disertační práce se zaměřuje na charakterizaci houbových společenstev v lesních půdách a jejich schopnosti rozkládat rostlinný opad. Jedním z cílů této práce bylo vypracovat metodiku pro přípravu ampliconových knihoven pro 454 pyrosekvenaci a využít ji pro podrobnou analýzu komplexních mikrobiálních společenstev z environmentálních vzorků. Za použití této metody byla stanovena diverzita a složení DNA a RNA společenstva hub a bakterií ve smrkovém lese (Článek I). Jelikož půdní vzorky pro analýzu byly odebrány pod čerstvě napadaným sněhem, tedy v období kdy v půdě převažují rozkladné procesy,

předpokládalo se, že mikrobiální rozkladači budou více transkripčně aktivní. Dalším cílem bylo kvantifikovat v lesní půdě diverzitu genů a transkriptů genu *cbhI* kódující exocelulázu, což je enzym určující rychlost rozkladu celulózy. Cílem pokusu popsáném v Článku II bylo podrobně charakterizovat proces rozkladu opadu v lesní půdě. Pro tento účel byly sledovány změny ve složení a diverzitě houbového společenstva během 24 měsíců rozkladu dubového opadu. Pro specifickou charakterizaci rozkladu celulózy byly také studovány geny *cbhI*. Dále byla studována úloha endofytických hub při rozkladu opadu. Bylo předpokládáno, že složení houbového společenstva bude odrážet dostupnost živin a že diverzita hub poroste v průběhu rozkladu opadu jako důsledek zvyšující se heterogenity substrátu, který bude navíc obsahovat mrtvou biomasu časných rozkladačů. Článek III se zabýval studiem sezónních změn houbového společenstva v lesní půdě. Bereme-li v úvahu výraznou vertikální stratifikaci půdy, bylo předpokládáno, že složení houbového společenstva bude odrážet dostupnost živin v jednotlivých horizontech půdního profilu. Na základě výsledků ze Článku II, kde byly pozorovány výrazné změny ve složení houbového společenstva v průběhu rozkladu dubového opadu, obdobné změny byly očekávány v opadovém horizontu. V hlubších horizontech bylo předpokládáno vyšší zastoupení ektomykorhizních druhů v průběhu vegetační sezóny, zatímco vyšší podíl saprotrofních hub byl předpokládán v období kdy nedochází k toku uhlíku do půdy, protože ve Článku I bylo zjištěno, že saprotrofní druhy byly více metabolicky aktivní právě v tomto období. Cílem Článku IV bylo zjistit schopnosti půdních mikromycet rozkládat organické biopolymery. Tyto houby byly izolovány ze stejného místa, které bylo použito pro odběry vzorků ve Článcích II a III, kde přímá izolace DNA ukázala, že půdní mikromycety představují významnou část celkového houbového společenstva. Článek V se zaměřuje na vztah mezi chemickým složením rostlinného opadu a jeho rozkladem za laboratorních podmínek. Pro zjištění vlivu chemického složení opadu na rychlost rozkladu bez vlivu sukcesních změn v mikrobiálním společenstvu, jediný houbový druh (*Hypholoma fasciculare*) byl kultivován na různých druzích opadu, které se lišily v chemickém složení. Bylo předpokládáno, že obsah ligninu by mohl způsobovat vyšší produkci enzymů rozkládajících lignin, zatímco obsah dusíku by mohl inhibovat rozklad ligninu.

## Materiál a metodika

Seznam metod:

Odběr půdních vzorků

Kultivace hub

Měření enzymových aktivit

Kvantifikace houbové biomasy

Taxonomická identifikace houbových kmenů

Příprava amplikonové knihovny pro pyrosekvenaci

Bioinformatická analýza pyrosekvenačních dat

Analýza diverzity a statistické analýzy.

## Výsledky a diskuse

Pro podrobnou analýzu diverzity a složení houbových a bakteriálních společenstev a *cbhl* genů byla vypracována metoda pro přípravu amplikonových knihoven pro 454 pyrosekvenaci. Výsledky Článku I ukázaly, že diverzita a vyrovnanost bakteriálního společenstva je výrazně vyšší v porovnání s houbovým společenstvem. Vyšší vyrovnanost bakteriálních společenstev byla popsána v různých typech půd (Buée et al., 2009; Fierer et al., 2007). Složení mikrobiálního společenstva se výrazně lišilo mezi horizonty půdního profilu, tedy bakterie a zvláště houby se často vyskytovaly pouze v určitém půdním horizontu; totéž platilo i pro jednotlivé formy genu *cbhl*. Rozdíly ve složení houbových společenstev mezi horizonty půdního profilu potvrdily předchozí zjištění ve studiích Lindahl et al. (2007), O'Brien et al. (2005) a Rosling et al. (2003). Významné rozdíly ve složení společenstva byly pozorovány mezi DNA a RNA komunitou navzdory jejich podobné diverzitě. Některé bakteriální i houbové taxony vysoce abundantní v RNA vykazovaly jen velmi nízkou abundanci v DNA, což indikuje, že tyto druhy přes svoji nízkou početnost významně přispívají k dekompozičním procesům v půdách a ukazují, že studie založené pouze na DNA izolaci pravděpodobně pomíjejí výraznou část aktivních mikroorganismů.

Ve Článku II bylo zjištěno, že v zelených a senescentních listech převažovaly houby patřící mezi askomycety, což je v souladu s předchozími studiemi (Osono, 2002; Santamaría and Bayman, 2005), které využívaly kultivační metody a také v souladu s pyrosekvenační analýzou živých listů *Q. macrocarpa* (Jumpponen and Jones, 2009a, b). První rok



experimentu, popsaného ve Článku II byl charakterizován rychlým úbytkem hmotnosti opadu, snižováním poměru C/N a obsahu celulózy a také vyšší aktivitou celulólytických enzymů, což mělo za následek rychlejší rozklad celulózy. V tomto období přetrvávala dominance hub patřících mezi askomycety. Převaha askomycet v časných fázích rozkladu bukového opadu byla také zjištěna ve studii Schneider et al. (2012) za použití metaproteomického přístupu. Během druhého roku experimentu byla rychlost úbytku hmotnosti opadu pomalejší a poklesla aktivita celulólytických enzymů. Substrát byl bohatší na lignin a dusík a stoupla aktivita ligninolytických enzymů. Houby patřící mezi basidiomycety převážily nad askomycetami ve 24. měsíci rozkladu opadu. Dominance basidiomycet v pozdějších fázích rozkladu opadu byla pozorována i v předchozích studiích Duong et al. (2008) a Osono (2007). Ve Článku II bylo prokázáno, že sukcese hub během rozkladu opadu je mnohem rychlejší než se předpokládalo na základě studií, ve kterých byly použity kultivační metody (Frankland, 1998; Osono, 2007; Osono and Takeda, 2001; Tang et al., 2005).

Ve Článku III byla zjištěna výrazná vertikální stratifikace houbového společenstva v lesní půdě. Aktivita, množství biomasy a diverzita houbového společenstva se snižovali s hloubkou půdy a složení společenstva se výrazně lišilo mezi studovanými horizonty. Diverzita vyjádřená jako počet OTU představující 80% houbového společenstva byla průměrně 90 v opadovém horizontu, 51 v organickém a 25 v minerálním. Tento výsledek nekoresponduje s výsledkem ve Článku I a se studií O'Brien et al. (2005), kde nebyly mezi jednotlivými půdními horizonty pozorovány významné rozdíly v diverzitě houbového společenstva. Sezónní vlivy na složení houbového společenstva byly v porovnání s hlubšími horizonty více patrné v opadovém horizontu. Saprotrofní rody *Mycena*, *Mycosphaerella* a *Naevula* se v opadovém horizontu svým zastoupením mezi sezónami lišily 30x, 200x a 350x. *Mycena* představovala nejhojnější rod v opadovém horizontu a výrazně dominovala na jaře, kdy je dostupný substrát bohatý na živiny. Pro letní období v opadovém horizontu byl typický nejvyšší výskyt ektomykorhizních hub. Vyšší výskyt ektomykorhizních hub v pozdním létě nebo na podzim byl pozorován v organickém a minerálním horizontu v boreálních lesích (Wallander et al., 2001) a také při studiu hub asociovaných s mechorosty (Davey et al., 2012). Na rozdíl od opadového horizontu, který vykazoval sezónní změny ve složení společenstva, v minerálním půdním horizontu byly patrné významné sezónní změny v množství houbové biomasy. Množství houbové biomasy se v minerálním horizontu od jara do léta zvýšilo zhruba třikrát, pravděpodobně v důsledku alokace toku uhlíku do půdy v průběhu vegetační sezóny.

Více než polovina izolátů ze Článku IV patřila do rodů *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Mucor* a *Trichoderma*. Tyto houby byly opakovaně izolovány z lesních i zemědělských půd (De Bellis et al., 2007; Grishkan, 1996; Keller and Bidochka, 1998). Ve Článku IV pouze 6 izolátů mikromycet ze 29 testovaných vykazovalo fenoloxidázovou aktivitu, která navíc byla nízká. U všechny testovaných kmenů hub nepatřících mezi basidiomycet nebyla detekována žádná aktivita ligninolytických peroxidáz a jen velmi nízká aktivita enzymů rozkládajících hemicelulózu, zatímco u saprotrofních basidiomycet byla zaznamenána poměrně vysoká produkce těchto enzymů (Steffen et al., 2007; Valášková et al., 2007). Na druhou stranu byly mikromycety schopné produkovat řadu celulólytických a chitinolytických enzymů.

Ve Článku V bylo ukázáno, že během dvanáctitýdenního růstu *Hypholomy fasciculare* (saprotrofní basidiomyceta) na jedenácti typech opadu s rozdílným chemickým složením, činil úbytek hmotnosti opadu 16-34%. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s 19-44% úbytkem hmotnosti březového opadu během 3 měsíčního rozkladu houbami *Mycena* a *Collybia* (Osono a Takeda, 2006). V časných fázích rozkladu vysoký obsah dusíku v opadu pozitivně koreloval s úbytkem hmotnosti opadu a s obsahem ergosterolu. Nicméně, na rozdíl od původních předpokladů, obsah ligninu neměl vliv na úbytek hmotnosti substrátu a výrazně neovlivňoval růst houby. Počáteční úbytek hmotnosti opadu pozitivně koreloval s aktivitami arylsulfatázy, celobiohydrolázy, endoxyfanázy a fosfatázy, nejvyšší aktivita ligninolytických enzymů byla naměřena na začátku pokusu. Úbytek ligninu nekoreloval s aktivitou lakázy a Mn-peroxidázy, i když jsou tyto enzymy považovány za velmi důležité při rozkladu ligninu (Baldrian, 2006; Hofrichter, 2002).

## **Závěry**

Tato práce zahrnuje výsledky publikované v pěti článcích a zabývá se složením a funkcí houbových společenstev v lesních půdách, zejména jejich rolí při rozkladu rostlinného opadu. Jako součást této práce byla vypracována metodika pro podrobnou analýzu komplexních mikrobiálních společenstev, která byla využita pro analýzu environmentálních vzorků. Dále se podařilo kvantifikovat diverzitu genu pro exocelulázu v půdním vzorku.

Ve smrkovém lese bylo ukázáno, že struktura mikrobiálního společenstva se liší mezi horizonty půdního profilu a že bakterie a zvláště houby a jednotlivé formy genu *cbhI* se často vyskytovaly pouze v určitém půdním horizontu. Významné rozdíly ve složení společenstva byly pozorovány mezi DNA a RNA komunitou navzdory jejich podobné diverzitě. Několik

mikrobiálních taxonů vysoce abundantních v RNA vykazovalo jen velmi nízkou abundanci v DNA, což indikuje, že tyto druhy přes svoji nízkou početnost významně přispívají k rozkladným procesům v půdách.

Rozklad opadu dubu letního je vysoce komplexní proces ovlivněný řadou houbových taxonů, které vykazují rychlou sukcesí a výrazné změny ve složení společenstva. Většina početných taxonů pouze dočasně dominovala v substrátu. Endofytické houby představují významnou část společenstva v počátečních fázích rozkladu opadu.

Aktivita, množství biomasy a diverzita houbového společenstva klesá s hloubkou půdy a jeho složení se výrazně liší mezi třemi zkoumanými horizonty v opadavém lese s dominantním dubem letním. Společenstvo v opadu vykazuje významné sezónní změny. V opadovém horizontu dosahují saprotrofní rody svého sezónního maxima na podzim, zatímco pro léto je typický nejvyšší výskyt ektomykorhizních hub. Zatímco složení houbového společenstva v opadu se výrazně měnilo v průběhu roku, minerální půdní horizont vykazoval změny v množství houbové biomasy. Výsledky ukazují, že složení houbového společenstva je převážně ovlivněno procesem rozkladu opadu a alokací fotosyntátů do půdy.

Houby izolované z lesní půdy se navzájem lišily schopností rozkládat půdní biopolymery. Houby nepatřící mezi saprotrofní basidiomycety pravděpodobně nehrají důležitou roli v rozkladu ligninu, ale jsou schopny produkovat řadu celulólytických a chitinolytických enzymů, což je předurčuje k aktivní roli při rozkladu lignocelulózy nebo mrtvé houbové biomasy.

V experimentu, kde byl zkoumán rozklad opadu jedinou saprotrofní houbou, rychlost rozkladu závisela na obsahu dusíku v opadu. Obsah ligninu neměl vliv ani na úbytek hmotnosti, ani na aktivitu ligninolytických enzymů. Tento výsledek naznačuje, že aktivita ligninolytických enzymů je pravděpodobně méně vhodným indikátorem dekompozice ligninu než se předpokládalo.



**Charles University in Prague**  
**Faculty of Science**



Summary of Ph.D. Thesis

**Molecular biology of soil fungi participating in litter  
decomposition in forest ecosystems**

**Mgr. Jana Voříšková**

Prague, 2013

## Abstract

In forest ecosystems, substantial part of carbon enters soil in the form of plant litter. The decomposition of litter and soil organic matter represents an important process affecting nutrient cycling and carbon balance in soils. Fungi are considered the primary decomposers in terrestrial ecosystems due to the production of wide range of extracellular enzymes that allow them to attack the lignocellulose matrix in litter. Even if fungi represent key players in organic matter decomposition, the information about the structure and diversity of their communities is still limited and the roles of individual fungal taxa in forest soils remain unclear.

This Ph.D. thesis focused on the characterization of fungal communities in forest soils and their potential to decompose plant litter. The method for in-depth analysis of complex microbial communities from environmental samples was established and used. In addition, single eukaryotic functional gene was analysed in soil for the first time at a depth that allowed reliable estimation of diversity.

It was demonstrated that microbial community composition differs among horizons of forest soil profile. Despite similar diversity, significant differences in microbial community composition were observed between the DNA and RNA. Several microbial groups highly abundant in RNA pool showed only low abundance in DNA community indicating that low-abundance species make an important contribution to decomposition processes in soils. During plant litter decomposition, fungal community undergoes rapid succession with dramatic changes in its composition and most of the abundant taxa only temporarily dominate in the substrate. In forest soil, fungal activity, biomass and diversity decrease substantially with depth. The structure of fungal community in forest soil is distinctively influenced by the seasonal effects which are most apparent in the litter horizon. In the litter horizon, saprotrophic genera reached their seasonal maxima in autumn but summer typically saw the highest abundance of ectomycorrhizal taxa. While the composition of the litter community changed over the course of the year, the mineral soil rather showed changes in fungal biomass. Non-basidiomycetous fungi isolated from forest soil differed from saprotrophic basidiomycetes in their ability to decompose biopolymers present in litter and soil. Non-basidiomycetous fungi likely do not play significant role in lignin degradation but are able to produce a range of cellulolytic and chitinolytic enzymes giving the evidence that they are actively engaged in decomposition of lignocellulose and dead fungal biomass. Concerning the effect of chemical composition of litter on its decomposition rate, it was demonstrated that

litter nitrogen content positively correlates with litter mass loss while lignin content does not have any effect neither on the litter mass loss nor the activity of ligninolytic enzymes. This result suggests that the activity of ligninolytic enzymes is probably a less suitable indicator of lignin decomposition than expected.

## **Introduction**

Temperate forests belong among the major biomes on Earth, covering the area of 570 million ha (FAO and JRC, 2012). In forest ecosystems, important part of carbon enters the soil in the form of plant litter (Berg and McClaugherty, 2003). Trees of deciduous forests are characterized by seasonal abscission of senescent leaves that is limited to autumn when fresh litter with easily available nutrients accumulates on the forest floor (Šnajdr et al., 2011). In forest soils, as a consequence of litter input and its microbial transformation, it is possible to recognize three main compartments of the profile: litter horizon, containing almost exclusively organic matter derived from dead plant biomass (L), organic (humic) horizon, representing a mixture or processed plant-derived organic matter and soil components (H) and mineral soil horizon with low content of organic matter originating both from the organic matter decomposition and root exudation (Ah).

Plant litter consists of several classes of organic compound. The quantitatively most abundant components in plant litter are polymeric carbohydrates such as cellulose and hemicelluloses and the complex aromatic polymer lignin. Plant litter decomposition is the primary route through which nutrients return to the soil (Berg et al., 2001) and in natural ecosystems it is mainly driven by fungi, bacteria, and invertebrates (Hattenschwiler et al., 2005). In temperate forests, fungi play a pivotal role in this process and especially saprotrophic basidiomycetes are considered to be the most important group of microorganisms involved in the breakdown and chemical conversion of litter components (Baldrian, 2008).

Fungi are able to produce large sets of extracellular degradative enzymes allowing them to attack the recalcitrant lignocellulose matrix. Fungal system of hydrolytic enzymes for efficient cellulose degradation usually consists of three enzymes: endo-1,4- $\beta$ -glucanase, cellobiohydrolase and 1,4- $\beta$ -glucosidase (Baldrian and Valášková, 2008) and ligninolytic set of enzymes is composed of oxidases, peroxidases and enzymes producing hydrogen peroxide. Extracellular enzyme production in environmental samples is often analysed by enzyme assays that indicate the activity of microbial community. It is, however, not possible to

directly link these observations to the activity of individual microbial taxa. Several recent studies showed that genes and transcripts encoding for laccase, Mn-peroxidase, class II peroxidases, cellulolytic and other hydrolytic and oxidative enzymes can be analysed in environmental samples (Bodeker et al., 2009; Damon et al., 2012; Edwards et al., 2008; Kellner and Vandenbol, 2010; Luis et al., 2004; Uroz et al., 2013). For example Edwards et al. (2008) examined the diversity and distribution of the genes encoding for cellobiohydrolase (*cbhI*), the rate-limiting enzyme for the decomposition of cellulose, in forest soils.

Decomposition of leaf litter is a sequential process that initially involves the loss of the less recalcitrant components followed by the degradation of the remaining highly recalcitrant compounds such as lignin. Litter quality changes during the course of its transformation and so does the activity of litter-associated microorganisms (Dilly et al., 2001) reflecting the varied catabolic capabilities that are sequentially required to complete the process of litter decomposition (Frankland, 1998; Osono, 2006). In forest soils the availability of nutrients distinctively differs through the soil profile (Šnajdr et al., 2008) thus the vertical stratification is characteristic feature of forest soils. The vertical distribution of fungal community in boreal and temperate forests has been previously described by Lindahl et al. (2007) and O'Brien et al. (2005) who showed distinct spatial separation of saprotrophic and mycorrhizal communities. Observations from diverse forest soils suggest that environmental factors such as temperature, water availability and substrate quality may be important factors affecting microbial community composition (Aponte et al., 2010; Kaiser et al., 2010; Kuffner et al., 2012; Landesman and Dighton, 2011). The seasonal occurrence and changing intensity of photosynthetic activity of trees have been found to result in seasonality of belowground carbon flow and carbon availability to microbes in forest soil (Högberg et al., 2010; Kaiser et al., 2010).

The chemical composition of litter varies among plant species and is known to affect the rates of its decomposition (Hattenschwiler and Gasser, 2005). In order to assess the relation between litter chemistry and decomposition without the effect of successive changes in microbial community composition, several studies followed the litter decomposition by single fungal species under defined laboratory conditions (Osono and Takeda, 2002, 2006; Steffen et al., 2007). However, broader information about relationship between the roles of individual litter components on the decomposition rate remains still largely limited.



## Hypothesis and aims

My Ph.D. thesis focuses on characterization of fungal communities in forest soils and their abilities to decompose plant litter. In order to get in-depth characterization of microbial communities in forest soils, it was aimed to establish the method of targeted amplicon library preparation for 454 pyrosequencing. Using this approach the biodiversity and structure of DNA and RNA-derived community of fungi and bacteria in spruce forest soil were analyzed (Paper I). Furthermore, it was demonstrated how the DNA and RNA communities differ and what part of the total community is metabolically active at a given moment. Because the soil sampling was performed under freshly fallen snow, in the period when decomposition processes in soil prevail, it was expected that decomposer microorganisms will be transcriptionally more active. It was also aimed to specifically target the important rate-limiting step in the process of cellulose decomposition by analyzing the genes and transcripts of the *cbhI* cellobiohydrolase (exocellulase). The experiment described in Paper II was aimed to provide a detailed characterization of the process of litter decomposition in forest soil. For this purpose the changes in fungal community composition and diversity were studied during 24 months of oak litter *in situ* decomposition. To specifically address the decomposition of cellulose, the composition of the gene pool of the *cbhI* was monitored. In order to evaluate the role of phyllosphere fungi in litter decomposition, fungal communities associated with live oak leaves and senescent leaves before their abscission were also analysed. It was expected that the structure of fungal community would reflect the availability of nutrients and the fungal diversity would increase during the process of decomposition as a consequence of the increase of substrate heterogeneity and the formation of new niches containing the dead biomass of early decomposers. Paper III studied the seasonal changes of fungal community in a forest soil. Considering the sharp and distinct vertical stratification, it was hypothesised that the structure of the fungal community would reflect the availability of nutrients in the horizons of soil profile. Based on the results obtained in Paper II, where considerable temporal shifts in fungal community structure during the decomposition of oak litter were observed, similar changes in the litter horizon were anticipated because the last year's litter represents a considerable percentage of the total litter mass. In the deeper horizons, a shift from a high relative abundance of ectomycorrhizal taxa during the vegetative season to a high proportion of saprotrophic taxa in the absence of root C allocation was expected because Paper I showed that saprotrophic taxa were more metabolically active in the absence of photosynthesis carbon allocation belowground. In Paper IV, it was aimed to compare the

decomposition abilities of basidiomycetous and non-basidiomycetous fungi. Non-basidiomycetous fungi were isolated from the same study site that was studied in Paper II and Paper III because the direct analysis of DNA from this ecosystem showed that nonbasidiomycetous fungi represented considerable proportion of the entire fungal community. Paper V focused on the relationships between chemical composition of plant litter and its decomposition under laboratory conditions. To assess the relationships between litter chemistry and decomposition without the effects of temporary changes in microbial community composition, single fungal species (*Hypholoma fasciculare*) was grown on different types of litter that differed in chemical composition. It was hypothesized that the content of lignin in litter would cause high production of ligninolytic enzymes to increase the availability of carbohydrates while a high N content would inhibit lignin decomposition.

## **Material and methods**

List of methods:

Soil sample collection

Cultivation of fungi

Enzyme assays

Quantification of fungal biomass

Taxonomic identification of fungal strains

Library preparation for tag-encoded amplicon pyrosequencing

Bioinformatic analysis of pyrosequencing data

Diversity and statistical analysis

## **Results and discussion**

In order to get deeper insight into the fungal and bacterial community composition as well as the structure and diversity of the *cbhI* gene (transcript) pools in forest soil the method of targeted amplicon library preparation for 454 pyrosequencing platform was established. In Paper I it was demonstrated that diversity of bacterial community is considerably higher than the diversity of fungal population and bacterial communities were more even than fungal ones and showed lower relative abundance of dominant species. Higher evenness of bacterial

communities compared to fungal in different soils can be anticipated from the results published by Buée et al. (2009) and Fierer et al. (2007). Microbial community composition differed among horizons of soil profile, thus bacteria and especially fungi together with *cbhl* clusters were often distinctly associated with a particular soil horizon. The among-horizon differences in fungal communities have been previously shown by Lindahl et al. (2007), O'Brien et al. (2005) and Rosling et al. (2003). Despite similar diversity, significant differences in microbial community composition were observed between the DNA and RNA. Several microbial groups highly abundant in RNA pool showed only low abundance in DNA community indicating that low-abundance species make an important contribution to decomposition processes in soils and also suggesting that DNA-based surveys likely miss considerable portions of active microbial populations.

In Paper II it was demonstrated that live and senescent leaves on *Quercus petraea* were dominated by phyllosphere fungi belonging to *Ascomycota* which is in accordance with previous culture-based studies (Osono, 2002; Santamaría and Bayman, 2005) as well as with pyrosequencing analyses of live *Q. macrocarpa* leaves (Jumpponen and Jones, 2009a, b). The first year of our experiment in Paper II was characterised by a relatively rapid loss of litter mass, a decrease in the C/N ratio and the cellulose content, and a relatively high activity of cellulolytic enzymes which caused faster decomposition of cellulose. These conditions were associated with the continuous dominance of fungi from the *Ascomycota* phylum. Dominance of ascomycetous fungi in the early stages of beech litter decomposition was recently also demonstrated using metaproteomic approach (Schneider et al., 2012). During the second year, the rate of litter mass loss was relatively slow and the activity of cellulolytic enzymes decreased. Also, the substrate was richer in the recalcitrant lignin and nitrogen and characteristic with the increased activity of ligninolytic enzymes. Fungi from the *Basidiomycota* phylum distinctively prevailed over fungi from the *Ascomycota* phylum at month 24. In previous studies, basidiomycetous species have often been demonstrated to be dominant in the late stages of litter decomposition (Duong et al., 2008; Osono, 2007). In Paper II it was demonstrated that fungal succession during litter decomposition was much faster than so far expected from the culture-based studies (Frankland, 1998; Osono, 2007; Osono and Takeda, 2001; Tang et al., 2005) that divided fungi only into early, intermediate and late decomposers.

In Paper III it was demonstrated that fungal community in a *Quercus petraea* forest soil shows considerable vertical stratification; its activity, biomass and diversity substantially decreased with soil depth and its structure distinctively differed among the three horizons

studied. Diversity expressed as number of OTUs representing 80% of the fungal community was in average 90 in the litter horizon, 51 in the organic horizon and 25 in the Ah horizon. It is in contrast with Paper I and study of O'Brien et al. (2005) where no significant changes in fungal diversity among horizons were observed. The relative abundance of ectomycorrhizal basidiomycetes increased with soil depth which is in accordance with previous studies (Lindahl et al., 2007; O'Brien et al., 2005). Fungal community composition in the litter horizon was distinctively more affected by the season than the deeper layers. In litter horizon saprotrophic fungal genera *Mycena*, *Mycosphaerella* and *Naevula* showed 30×, 200× and 350× differences in abundance among seasons. The most abundant genera in litter layer represented saprotrophic *Mycena* which significantly peaked its abundance in spring when nutrient-rich substrate is available. Summer was characterised by dramatic increase of ectomycorrhizal fungi. Increasing abundance of ECM fungi in late summer or autumn in organic and soil horizons of boreal forest has been previously reported by Wallander et al. (2001) as well as by Davey et al., (2012) who studied bryophyte-associated fungal communities. In contrast to litter horizon, which showed profound seasonal changes in fungal community composition, Ah horizon rather responded in changes in fungal abundance. The fungal biomass content in the Ah horizons increased approximately threefold from spring to summer which corresponds with the expected increase in photosynthate allocation belowground.

Paper IV describes the decomposition potential of nonbasidiomycetous fungi. More than half of the isolates belonged to the genus *Penicillium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Geomyces*, *Mucor* and *Trichoderma*. These fungi have been repeatedly isolated from both forest and agricultural soils (De Bellis et al., 2007; Grishkan, 1996; Keller and Bidochka, 1998). Only six non-basidiomycetous isolates from 29 tested showed phenol oxidation activity which was low and all of the non-basidiomycetous strains showed lack of ligninolytic peroxidases that sharply contrasted with the high activity of ligninolytic enzymes in all tested basidiomycete strains. In Paper IV only limited production of hemicellulose-degrading enzymes by non-basidiomycetous fungi was reported that is in contrast with relatively high production of these enzymes by saprotrophic basidiomycetes (Steffen et al., 2007; Valaskova et al., 2007). On the other hand, non-basidiomycetous fungi were able to produce cellulolytic enzymes and the production of chitinases was in average higher than in basidiomycetes.

In Paper V it was shown that during 12-week growth of the saprotrophic basidiomycete *Hypholoma fasciculare* on 11 types of litter with variable chemical composition, the litter mass loss ranged from 16% to 34%. These values are comparable with

19-44% litter mass loss in birch litter after 3 months decomposition by *Mycena* and *Collybia* species (Osono and Takeda, 2006). During early decomposition stages increasing initial N content of the litter positively correlated with litter mass loss and ergosterol content. However, contrary to our expectation lignin content did not affect litter mass loss and was not an important factor determining fungal growth. The initial loss of litter mass significantly positively correlated with the activities of arylsulfatase, cellobiohydrolase, endoxylanase and phosphatase, the highest activity of ligninolytic enzymes were mostly detected at the beginning of the experiment. The loss of lignin was not correlated with laccase or Mn-peroxidase activity even if these enzymes are considered to play crucial role in lignin decomposition (Baldrian, 2006; Hofrichter, 2002).

## Conclusions

This work consists of 5 papers that contribute to the understanding of the composition of soil fungal communities and their role in the process of plant litter decomposition. Methods for in-depth analysis of complex microbial communities from environmental samples were established and for the first time single eukaryotic functional gene at a depth that allowed diversity estimations was analysed in soil samples.

In a spruce forest it was demonstrated that microbial community composition differs among horizons of soil profile and certain bacteria and especially fungi together with *cbhl* gene clusters are often associated with a particular soil horizon. Despite similar diversity of microbial communities based on DNA and RNA analysis, significant differences in community composition were observed. Several microbial groups highly abundant in RNA pool showed only low abundance in DNA community indicating that low-abundance species make an important contribution to decomposition processes in soils.

Plant litter decomposition in a *Quercus petraea* forest is a highly complex process mediated by various fungal groups that undergo rapid succession with dramatic changes in the community composition. Furthermore, most of the abundant taxa only temporarily dominate in the substrate. Phyllosphere fungi comprise a significant proportion of the community during early decomposition. Activity, biomass and diversity of fungal community in the soil of the same ecosystem decreases substantially with soil depth and its structure distinctively differs among the three horizons studied. The litter community exhibits profound seasonal changes. Abundance of the saprotrophic genera reaches their seasonal maximum in autumn,

while summer typically saw the highest abundance of ectomycorrhizal taxa. While the composition of the litter community changes over the course of the year, the mineral soil shows changes in biomass. It seems that fungal community composition is mainly affected by the progress of litter decomposition together with phytosynthate allocation.

Nonbasidiomycetous soil fungi differ from saprotrophic basidiomycetes in their ability to decompose soil biopolymers. They likely do not play significant role in lignin degradation but are able to produce wide range of cellulolytic and chitinolytic enzymes giving the evidence that they are actively engaged in decomposition of lignocellulose and dead fungal biomass.

In a decomposition experiment including a single saprotrophic basidiomycete, decomposition rate depended on litter nitrogen content. Lignin content did not have any effect neither on the decomposition rate nor the activity of ligninolytic enzymes indicating that the activity of these enzymes is probably a less suitable indicator of lignin decomposition than expected.

## Reference list

- Aponte, C., García, L.V., Marañón, T., and Gardes, M. (2010). Indirect host effect on ectomycorrhizal fungi: Leaf fall and litter quality explain changes in fungal communities on the roots of co-occurring Mediterranean oaks. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 788-796.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 215-242.
- Baldrian, P. (2008). Enzymes of Saprotrophic Basidiomycetes. In: *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes* (Boddy, Watkinson and van West, eds.), Academic Press, USA: 19-41.
- Baldrian, P., and Valaskova, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 501-521.
- Berg, B., McLaugherty, C., Santo, A.V.D. and Johnson, D. (2011). Humus buildup in boreal forests: effects of litter fall and its N concentration. *Canadian Journal of Forest Research* 31, 988-998.
- Berg, B., and McLaugherty, C. (2003). *Plant Litter* (Berlin, Springer).
- Bodeker, I.T.M., Nygren, C.M.R., Taylor, A.F.S., Olson, A., and Lindahl, B.D. (2009). ClassII peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi. *ISME Journal* 3, 1387-1395.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., and Martin, F. (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184, 449-456.

- Claus, H., and Filip, Z. (1998). Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 26, 180-185.
- Damon, C., Lehembre, F., Oger-Desfeux, C., Luis, P., Ranger, J., Fraissinet-Tachet, L., and Marmeisse, R. (2012). Metatranscriptomics Reveals the Diversity of Genes Expressed by Eukaryotes in Forest Soils. *Plos One* 7, e28967.
- Davey, M.L., Heegaard, E., Halvorsen, R., Ohlson, M., and 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 Bellis, T., Kernaghan, G., and Widden, P. (2007). Plant community influences on soil microfungal assemblages in boreal mixed-wood forests. *Mycologia* 99, 356-367.
- Dilly, O., Bartsch, S., Rosenbrock, P., Buscot, F., and Munch, J.C. (2001). Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 921-930.
- Duong, L.M., McKenzie, E.H.C., Lumyong, S., and Hyde, K.D. (2008). Fungal succession on senescent leaves of *Castanopsis diversifolia* in Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Fungal Diversity* 30, 23-36.
- Edwards, I.P., Upchurch, R.A., and Zak, D.R. (2008). Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3481-3489.
- FAO, and JRC (2012). Global forest land-use change 1990–2005, by E.J. Lindquist, R. D'Annunzio, A. Gerrand, K. MacDicken, F. Achard, R. Beuchle, A. Brink, H.D. Eva, P. Mayaux, J. San-Miguel-Ayanz & H-J. Stibig. FAO Forestry Paper No. 169. Food and Agriculture Organization of the United Nations and European Commission Joint Research Centre. Rome, FAO.
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R.A., Felts, B., Rayhawk, S., *et al.* (2007). Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7059-7066.
- Frankland, J.C. (1998). Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102, 1-15.
- Grishkan, I.B. (1996). Soil micromycetes of birch and aspen forests in the upper Kolyma River basin. *Mikologiya Fitopatologiya* 30, 28-35.
- Hattenschwiler, S., and Gasser, P. (2005). Soil animals alter plant litter diversity effects on decomposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1519-1524.
- Hattenschwiler, S., Tiunov, A.V., and Scheu, S. (2005). Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 36, 191-218.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30, 454-466.
- Högberg, M.N., Briones, M.J.I., Keel, S.G., Metcalfe, D.B., Campbell, C., Midwood, A.J., Thornton, B., Hurry, V., Linder, S., Näsholm, T., *et al.* (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.

Jumpponen, A., and Jones, K.L. (2009a). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184, 438-448.

Jumpponen, A., and Jones, K.L. (2009b). Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist* 186, 496-513.

Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Fuchslueger, L., Schnecker, J., Schweiger, P., Rasche, F., Zechmeister-Boltenstern, S., Sessitsch, A., and Richter, A. (2010). Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytologist* 187, 843-858.

Keller, L., and Bidochka, M.J. (1998). Habitat and temporal differences among soil microfungal assemblages in Ontario. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 76, 1798-1805.

Kellner, H., and Vandenbol, M. (2010). Fungi Unearthed: Transcripts Encoding Lignocellulolytic and Chitinolytic Enzymes in Forest Soil. *Plos One* 5, e10971.

Kuffner, M., Hai, B., Rattei, T., Melodelima, C., Schloter, M., Zechmeister-Boltenstern, S., Jandl, R., Schindlbacher, A., and 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

Landesman, W., and Dighton, J. (2011). Shifts in Microbial Biomass and the Bacteria: Fungi Ratio Occur Under Field Conditions Within 3 h After Rainfall. *Microbial Ecology* 62, 228-236.

Lindahl, B.D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S.E., Hogberg, P., Stenlid, J., and Finlay, R.D. (2007). Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173, 611-620.

Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., and Buscot, F. (2004). Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology Biochemistry* 36, 1025-1036.

O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.-M., and Vilgalys, R. (2005). Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5544-5550.

Osono, T. (2002). Phyllosphere fungi on leaf litter of *Fagus crenata*: occurrence, colonization, and succession. *Canadian Journal of Botany* 80, 460-469.

Osono, T. (2006). Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 701-716.

Osono, T. (2007). Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research* 22, 955-974.

Osono, T., and Takeda, H. (2001). Organic chemical and nutrient dynamics in decomposing beech leaf litter in relation to fungal ingrowth and succession during 3-year decomposition processes in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Ecological Research* 16, 649-670.



- Osono, T., and Takeda, H. (2002). Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia* 94, 421-427.
- Osono, T., and Takeda, H. (2006). Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia* 98, 172-179.
- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B.D., Larsson, K.H., Kuyper, T.W., Taylor, A.F.S., and Finlay, R.D. (2003). Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159, 775-783.
- Santamaría, J., and Bayman, P. (2005). Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50, 1-8.
- Schneider, T., Keiblinger, K.M., Schmid, E., Sterflinger-Gleixner, K., Ellersdorfer, G., Roschitzki, B., Richter, A., Eberl, L., Zechmeister-Boltenstern, S., and Riedel, K. (2012). Who is who in litter decomposition? Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. *ISME Journal* 6, 1749-1762.
- Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Herinková, J., Cajthaml, T., and Baldrian, P. (2008). Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology Biochemistry* 40, 2068-2075.
- Steffen, K.T., Cajthaml, T., Šnajdr, J., and Baldrian, P. (2007). Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. *Research in Microbiology* 158, 447-455.
- Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valášková, V., Merhautová, V., Petránková, M., Spetz, P., Leppänen, K., and Baldrian, P. (2011). Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology* 75, 291-303.
- Tang, A.M.C., Jeewon, R., and Hyde, K.D. (2005). Succession of microfungial communities on decaying leaves of *Castanopsis fissa*. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 967-974.
- Uroz, S., Ioannidis, P., Lengelle, J., Cébron, A., Morin, E., Buée, M., and Martin, F. (2013). Functional Assays and Metagenomic Analyses Reveals Differences between the Microbial Communities Inhabiting the Soil Horizons of a Norway Spruce Plantation. *Plos One* 8, e55929.
- Valášková, V., Šnajdr, J., Bittner, B., Cajthaml, T., Merhautová, V., Hoffichter, M., and Baldrian, P. (2007). Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology Biochemistry* 39, 2651-2660.
- Wallander, H., Nilsson, L.O., Hagerberg, D., and Bååth, E. (2001). Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist* 151, 753-760.
- Zheng, Z.X., Levin, R.E., Pinkham, J.L., and Shetty, K. (1999). Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochemistry* 34, 31-37.

# Curriculum vitae

## Jana Voříšková

---

Laboratory of environmental microbiology  
Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i.  
Vítěňská 1083  
142 00 Praha 4, Czech Republic

Office: +420241062502  
Cell: +420776667647  
E-mail: voriskovajana@centrum.cz

### EDUCATION

---

**Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic** **2009-present**  
Doctoral program  
Specialization: Molecular and cell biology, genetics and virology  
PhD thesis topic: Molecular biology of soil microorganisms participating in litter transformation in hardwood forest soils (supervisor Dr. Petr Baldrian)

**M.Sc., Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic** **2007-2009**  
Specialization: Molecular biology and genetics of eukaryotes  
Master thesis: The role of saprotrophic basidiomycetes in soil fungal community (supervisor Dr. Petr Baldrian)

**B.Sc., Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic** **2004-2007**  
Specialization: Molecular biology and biochemistry of organisms

### RESEARCH EXPERIENCE

---

**Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague** **2007-present**  
Full time position since 2009  
Institute of Microbiology, Laboratory of Environmental Microbiology  
Research advisor: Dr. Petr Baldrian

**University of Greifswald, Germany** **June-July 2012**  
Institute of Microbiology, Physiological Proteomics/Bioinformatics Group  
Research advisor: Prof. Dr. Katharina Riedel  
*Scientific internship*

**Helmholtz-Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany** **June 2011**  
Laboratory "Microbial Proteomics"  
Research advisor: Prof. Dr. Katharina Riedel  
*Scientific internship*

### TECHNICAL SKILLS

---

- isolation, identification and culturing of bacteria and fungi
- enzyme assays
- analysis of fungal biomarkers

- field work (soil sample collection)
- DNA, RNA and protein extraction from soil
- PCR, quantitative PCR, primer design
- DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), TRFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), cloning
- 454 amplicon and shotgun pyrosequencing (sample preparation, operation with GS Junior)
- sequence data analysis, construction of phylogenetic trees, statistical analysis

## SCIENTIFIC INTERESTS

---

Analysis of structure and functions of microbial communities in soils using fingerprinting methods, conventional sequencing, next generation sequencing (with emphasis on metagenomics and metatranscriptomics) and metaproteomics. Analysis of functional genes involved in soil organic matter transformation. Transformation of organic matter by microorganisms and its regulation.

## FELLOWSHIPS AND GRANTS

---

**Grant from the Grant Agency of the Charles University, Prague** **2011-2013**  
 Fungal community in hardwood forest soil - identification of active decomposers and expression of extracellular enzymes  
*Principal investigator*

**FEMS Research Fellowship** **2012**  
 Characterization of soil microbial communities engaged in lignocellulose decomposition using the combination of stable isotope probing with metaproteomics and metagenomics  
 University of Greifswald, Germany  
 Institute of Microbiology, Physiological Proteomics/Bioinformatics Group  
 Research advisor: Prof. Dr. Katharina Riedel

**FEMS Congress Grant for Young Scientists** **2011**  
 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2011)  
 Geneva, Swiss

**FEMS Young Scientist Meeting Grant** **2010**  
 9th International Mycological Congress (IMC9: The Biology of Fungi)  
 Edinburgh, United Kingdom

## RELEVANT COURSES

---

**Microbial Genomics and Metagenomics Workshop** **2012**  
 DOE JGI, Walnut Creek, California

**Real-Time qPCR methods** **2012**  
 Prague, Czech Republic

**Constraints on organic matter decomposition - from molecules to models** **2010**  
 Uppsala University, Sweden

**EMBO Young Scientists Forum** **2010**

Prague, Czech Republic

**PlutoF: Web-based management and analyses of the biodiversity data** **2010**  
University of Tartu, Estonia

**Workshop on Molecular Evolution** **2010**  
Český Krumlov, Czech Republic

## **SELECTED CONFERENCE PRESENTATIONS**

---

**Voříšková J.,** Brabcová V., Cajthaml T., Baldrian P.: Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate forest soil, 5<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, July 21-25, 2013. *poster*

**Voříšková J.,** Brabcová V., Cajthaml T., Baldrian P.: Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate forest soil, 26<sup>th</sup> Congress of the Czechoslovak Society for Microbiology, Brno, June 24-26, 2013. *oral*

**Voříšková J.,** Valášková V., Cajthaml T., Baldrian P.: Seasonal changes in fungal community structure and function in deciduous forest soil, 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Copenhagen, August 19-24, 2012. *oral*

**Voříšková J.,** Štursová M., Baldrian P.: Expression of fungal genes encoding for decomposition-related enzymes in forest soil, 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists (FEMS 2011), Geneva, June 26-30, 2011. *poster*

**Voříšková J.,** Štursová M., Baldrian P.: Diversity of fungal genes encoding enzymes catalysing decomposition processes in forest topsoil, Ecology of Soil Microorganisms, Prague, April 27 - May 1, 2011. *poster*

**Voříšková J.,** Šnajdr J., Valášková V., Baldrian P.: Characterization of fungal communities and cellobiohydrolase genes succession during litter degradation using parallel tag-encoded 454 sequencing, Soil metagenomics, Braunschweig, December 8-10, 2010. *poster*

**Voříšková J.,** Šnajdr J., Valášková V., Baldrian P.: 454 sequencing approach for the characterization of fungal communities and cellobiohydrolase genes succession on decaying hardwood forest litter, 25<sup>th</sup> Congress of the Czechoslovak Society for Microbiology, Stará Lesná, September 15-18, 2010. *oral*

**Voříšková J.,** Šnajdr J., Valášková V., Baldrian P.: Succession of fungal communities and cellobiohydrolase genes on decaying hardwood forest litter using parallel tag-encoded 454 sequencing, 13th International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, August 22-27, 2010. *poster*

**Voříšková J.,** Dobiášová P., Šnajdr J., Cajthaml T., Vaněk D., Šantrůčková H., Baldrian P.: Effect of litter composition on the growth and enzyme production by the saprotrophic basidiomycete *Hypholoma fasciculare*, 9th International Mycological Congress, Edinburgh, August 1-6, 2010. *poster*

**Voříšková J.:** The activity and structure of fungal community in deciduous forest soil, XIX. Conference of Young Microbiologists, Brno, June 3-4, 2010. *oral*

**Voříšková J.:** The activity and structure of fungal community in deciduous forest soil, Czech-Slovak Scientific Mycological Conference, Brno, August 27-29, 2009. *oral*

**Voříšková J.,** Popelářová P., Merhautová V., Valášková V., Baldrian P.: Soil Organic Matter Transformation by Saprotrophic Microfungi from the Upper Layers of Forest Soil. International Symposium on Soil Organic Matter Dynamics: Land Use, Management and Global Change, Colorado Springs, July 6-9, 2009. *poster*

**Voříšková J.,** Valášková V., Cajthaml T., Baldrian P.: Structure and activity of fungal community with emphasis on basidiomycetes in a soil profile of hardwood forest. 10<sup>th</sup> International Symposium on Bacterial Genetics and Ecology, Uppsala, June 15-19, 2009. *poster*

# List of publications

## Papers related to Ph.D. thesis

### Paper I

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. IF<sub>2012</sub> 8.93

### Paper II

Voříšková, J., Baldrian, P. (2013) Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME Journal* 7: 477-486. IF<sub>2012</sub> 8.93

### Paper III

Voříšková, J., Brabcová, V., Cajthaml, T., Baldrian, P. Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist*, *in press*. IF<sub>2012</sub> 6.74

### Paper IV

Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., Valášková, V. (2011) Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil* 338: 111-125. IF<sub>2012</sub> 2.64

### Paper V

Voříšková, J., Dobiášová, P., Šnajdr, J., Vaněk, D., Cajthaml, T., Šantrůčková, H., Baldrian, P. (2011) Chemical composition of litter affects the growth and enzyme production by the saprotrophic basidiomycete *Hypoholoma fasciculare*. *Fungal Ecology* 4: 417-426. IF<sub>2012</sub> 2.85

## Other papers

Crowther, T.W., Stanton, D.W.G., Thomas, S.M., A'Beir, A.D., Hiscox, J., Jones, T.H., Voříšková, J., Baldrian, P., Boddy, L. (2013) Top-down control of soil fungal community composition by a globally distributed keystone consumer. *Ecology*, *in press*. IF<sub>2012</sub> 5.18

Kotík, M., Davidová, A., Voříšková, J., Baldrian, P. (2013) Bacterial communities in tetrachloroethene-polluted groundwaters: a case study. *Science of the Total Environment* 454-455: 517-527. IF<sub>2012</sub> 3.26

Větrovský, T., Voříšková, J., Šnajdr, J., Gabriel, J., Baldrian, P. (2011) Ecology of coarse wood decomposition by the saprotrophic fungus *Fomes fomentarius*. *Biodegradation* 22: 709-718. IF<sub>2012</sub> 2.17