

V Praze, dne 15. 4. 2020

Věc: Posudek disertační práce Mgr. Michala Chomy "Effect of anthropogenic nitrogen inputs on the structure and function of ectomycorrhizal communities in spruce forest"

Předkládaná disertační práce je souborem čtyř publikací, z nichž tři jsou již vyšlé nebo přijaté do tisku, čtvrtá z nich je ve stádiu rukopisu. Téma práce řeší zajímavou a aktuální otázku vlivu depozice dusíku na výskyt ektomycorrhizních hub a fungování ekosystémů. Kladené otázky jsou zajímavé, ale vzhledem k volené metodice z velké části odpovídají hlavně na první část otázky (složení společenstev hub), zatímco otázka fungování ektomycorrhizních komunit není prakticky řešena – pomocí použitých metodických přístupů to ani není dost dobře možné. Práce nicméně obsahuje zajímavé postřehy o biogeochemii a fungování ekosystémů jako celku, které podle mě tento nedostatek vyváží.

Předkladatel je prvním autorem článku, publikovaného v časopise Fungal Ecology a článku, který je zařazen ve formě rukopisu, na dvou článcích publikovaných nebo přijatých k publikaci v časopise Soil Biology & Biochemistry je předkladatel druhým autorem vícečlenného autorského kolektivu, v obou případech je jeho podíl na vzniku prací zásadní. Všechny publikované práce jsou podle mého názoru dostatečně kvalitní a poměrně kvalitní je i rukopis čtvrtého článku, který zatím publikován nebyl. Jako takové představují publikované články s manuskriptem dostatečný důkaz o kvalitě vědecké práce autorského týmu, jehož byl předkladatel členem. Práce je opatřena úvodem, přehledem cílů práce, souhrnem experimentů a popisem studovaných ekosystémů a krátkou diskusí. Rozsah je dostačující, i když v případě diskuse bych uvítal delší rozsah, umožňující lepší zasazení práce do kontextu. Formální a jazyková stránka disertace, která je zpracována v anglickém jazyce, je na velmi dobré úrovni.

Úvod do problematiky je celkově dobře zpracován, zahrnuje zejména práce, které byly předkladateli známy v době, kdy se podílel na příslušných experimentech a tvoří tak logické pozadí experimentálních přístupů. K úvodu mám tyto otázky:

Autor uvádí, že frekvence ektomycorrhizní kolonizace kořenových špiček je až 100%. Má představu o tom, jaké jsou typické hodnoty tohoto ukazatele?

Je uvedeno, že ektomycorrhizní houby (ECM) mají nelimitovaný přístup k uhlíku. To jistě víceméně platí pro letní období, kdy probíhá rhizodepozice. Jak je to ale s přístupem ECM k uhlíku v zimním období?

Nesouhlasil bych s tvrzením, že existuje jasná představa o saprotrofních schopnostech ektomycorrhizních hub. Sekvenovaných genomů je málo a genomický potenciál má velmi daleko k expresi jednotlivých genů v půdách. Co se skutečně ví o saprotrofních schopnostech ECM hub?

Na straně 12 je uvedeno, že ECM houby v půdách dusíkem chudých „enzymaticky dolují živiny“. Bylo to někdy přímo prokázáno in situ? Pokud ano, jaké enzymy se účastní a jakým mechanismem?

Na stejné straně se uvádí, že saturace dusíkem vede k omezení fruktifikace ECM hub a redukci mycelia. Jak je tedy možné vysvětlit, že v dusíkem bohatých půdách Šumavy tvoří ECM houby často >70% biomasy hub?

Na straně 13 je uvedena klasifikace ECM hub na nitrofilní a nitrofobní. S některými údaji se ale nelze ztotožnit, například rod *Piloderma* je častý v dusíkem bohatých půdách (zde uváděn jako nitrofobní). Klasifikaci vztahu ECM k dusíku provedl van der Linde 2018 v čas. Nature. Jak se shoduje použitá klasifikace s jeho výsledky? Tuto informaci jsem očekával v diskusi, ale nenalezl jsem ji.

Velmi se mi líbí experimenty, které byly provedeny, zejména dlouhodobé experimenty s přidavkem živin. Myslím, že jejich experimentální využití bylo skutečně vhodně voleno a otázky, které si práce klade je právě díky existenci těchto experimentů možné řešit.

V článku 2 mě zaujal malý počet druhů ECM hub, ovlivněných experimentálním uspořádáním. Kdo jsou další členové společenstva hub, kromě ECM hub a u jakého procenta z nich nebylo možné určit jejich ekologii? V této studii by bylo vhodné doplnit údaje o celkové biomase hub, bez ní není možné dovodit absolutní reakci ECM hub či jednotlivých taxonů na experimentální uspořádání. Jsou tyto údaje k dispozici?

V článku 3 hovoří nadpis o „Pozitivní reakci půdních mikroorganismů“. Co v tomto kontextu znamená slovo pozitivní?

Zaráží mě velmi vysoký podíl plísně *Umbelopsis* v některých vzorcích. Vzorky s takto vysokým podílem plísní většina autorů považuje za artefakty nevhodného skladování vzorků, při kterém se plísně mohou pomnožit. Může to být důsledkem velmi dlouhého pobytu odebrané půdy mimo mrazák (3 dny při 4°C)?

Článek 4 si všímá zejména acidifikace, která je jedním z důsledků přidavku dusíku. Vliv přidavku dusíku na jeho koncentraci v půdě nicméně není významná.

V abstraktu autor říká, že „acidity-driven shifts in bacterial community composition influenced the stoichiometry“ a „bacterial abundance influenced magnitude of enzymatic activity“. Jak byla prokázána kauzalita tohoto vztahu a které výsledky umožňují vyloučit, že vliv je opačný (stechiometrie ovlivňuje bakteriální společenstvo, dostupnost živin daná aktivitou enzymů ovlivňuje četnost bakterií)?

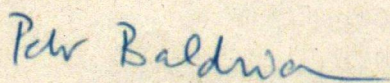
U obrázku 1 by mě zajímalo, zda vliv pH na složení společenstva hub je rovněž významný, pokud se vzorky smrku a buku analyzují zvlášť. Je známo, že dominantní dřevina má významný vliv na složení společenstev hub.

Na závěr mám k práci několik obecných otázek. Poskytují výsledky podporu pro tvrzení, že společenstvo ECM hub tvoří nitrofilní a nitrofobní druhy? A lze je nyní jednoznačně definovat?

Jaké experimentální uspořádání, by podle předkladatele umožnilo ještě lepší zodpovězení otázek o vlivu dusíku na ekosystémy? Je porovnání experimentálních ploch v jeden časový okamžik tím optimálním řešením?

Jaký je podle autora kvantitativní význam fixace dusíku v lesních půdách na dusík chudých v podmínkách nízké atmosferické depozice? Může chybějící depozici zcela nahradit fixace?

Celkově práci považuji za vyhovující pro udělení titulu PhD.



Petr Baldrian

Effect of anthropogenic nitrogen inputs on the structure and function of ectomycorrhizal communities in spruce forests

The reported thesis consists of four papers (3 published in high-valued scientific journals and one at the state of advanced manuscript preparation) preceded by 34 pages of sections that present general introduction to the topic, aims, description of experimental background, discussion and general conclusions.

I suppose I can rely on the fact that the three published articles underwent a high-quality review process before they were accepted for publication. Then, I focused my review mainly on the other parts of the thesis and on the general aspects discussed.

The section "Introduction/General introduction" provides an insight to mycorrhizal symbiosis, characteristics of ectomycorrhizal symbiosis and ectomycorrhizal fungi, ecophysiology of this type of symbiosis including its interaction with nitrogen biogeochemical cycle and anthropogenic nitrogen sources. This section also includes the general review of literature data on the response of the community of ectomycorrhizal fungi to anthropogenic enrichment by bioavailable nitrogen. The author finally tracks the process of the recovery of ectomycorrhizal community from the state of excessive nitrogen inputs.

It seems that the introductory section covers all important aspects of ectomycorrhizal symbiosis at elevated nitrogen supply including some working hypotheses that have been formulated in the past about the mechanisms behind the regulation of the symbiosis at ecosystem level.

Regarding the effects of acidification and eutrophication of the forest soils (pg. 11), a pioneering paper has been published by Fellner and Pešková (1995, Can J Bot 73: S1310-S1315) which shows high sensitivity of ectomycorrhizal symbiosis to these factors in permanent experimental plots in the Czech Republic. Is this paper known to the author?

Aims and objectives (pg. 19-20) are clearly described. The author emerges a hypothesis (objective II) suggesting that the " ... retreat of nitrophobic (EMF) species hampers the soil N retention capacity". This idea is also projected to objective III and certainly would merit a brief justification at this place as it is one of the main leading ideas of the thesis. Some explanation

is suggested from the text at pg. 13 where the nitrophilic and nitrophobic character of ECM fungi is defined *sensu* Lilleskov et al. (2011). Some literature data (pg. 13) suggest that nitrophobic fungi produce large mycelial biomass soil with high absorption capacity which is not the case of nitrophilic ECM fungi, and this is reflected in hypothetical increase in N losses if nitrophobic species are replaced by nitrophilic ones. I believe that this straightforward explanation of the hypothesis would enhance the digestibility of this section.

In fact, the decrease of nitrogen retention at high N inputs has been reported previously by other authors (cited for example on pg. 14) which was probably an inspiration and impetus for the author of the thesis. The question appears, however, why the "luxurious nitrogen" is hypothetically not exploited for example by higher plant biomass produced due to fertilization effect. I think, this alternative hypothesis is important, regarding the results that were finally obtained by the author and his collaborators, and might be mentioned in Aims and Objectives.

It can be seen on pg. 10 (top) that "The N cycle is closed" which means that only a negligible losses of nitrogen do occur in the N-limited forest ecosystem. The other valid meaning of the "closing" of the nitrogen cycle is the flux of nitrogen through the denitrification process, converting nitrate to molecular nitrogen. It is thus questionable whether the same term should be used for these two contrasting things.

In the section Discussion (pg. 27, 2nd paragraph), the author states that "The size of experimental plots may be insufficient to significantly influence C allocation of host trees ...". This statement is incorrect. It seems that, in the context of the experiment, the plot size should not affect anything, but may be insufficient to provide the resolution power necessary to obtain significant results.

We further read in the Discussion (pg. 28, middle) that "We did not observe any decrease either in fungal gene marker or in its proportion to bacterial marker, which would indicate a change in fungi-to-bacteria ratio (III)". Table 4 in publication III (pg. 83) shows relatively high variation in this parameter which might indicate that this result is inconclusive and should be discussed as such.

Though the hypothesis about the decrease of N retention on the ecosystem under high N input has not been confirmed, I have to score the related research as very successful. This result is optimistic and means that nature forgives us for the "sin" of eutrophication, at least

in terms of nitrogen storage in soil. At the same time, this result indicates that the N immobilization process in soil is driven by other factors than the absorption by extensive mycelium formed by nitrophobic ECM fungal species. What is the opinion of the author about this problem? Is it possible that even the less extensive mycelium of nitrophilic species is able to absorb almost all the supplied N at high input ecosystems? Or, is it possible that the concept of nitrophobes/nitrophiles with contrasting N-absorption capacity is not always strictly valid?

Other optimistic finding is that increased N input must be of long-term duration (publications II and IV) to affect significantly the composition of ECM fungal communities and the original community partially recovers after the termination of increased N supply (publication II). Does the author mean that the low speed of the recovery is caused only by the nitrogen retention in soil, or the nitrophilic fungal species are persistent for some period even after the soil N content has returned to about its original value?

The data in publication IV were evaluated using permutation analysis. Is the author aware about the fact that the significance of the effects of factors by PERMANOVA is proved only when the dispersion of the data is homogeneous? I was not able to find a note about the testing the dispersion homogeneity (for example by Betadisper tool) in the Material and methods section.

The thesis presents the results of original research of high theoretical and practical importance. At the same time, the author of the thesis contributed significantly to this research. Taking these facts into account, I came to conclusion that the defendant is competent to perform scientific research, to receive and evaluate the results and to publish the findings. Based on the above said, I recommend to accept the thesis as eligible to award the author the Ph.D. degree in Biological Sciences.

In Soběnice, 13. 4. 2020



Milan Gryndler

Dept. Biology, Fac. Science
J. E. Purkyně University in Ústí nad Labem
Czech Republic