



wissenswert

Langfristige Ökosystembeobachtung - Endbericht Modul 04: Bodenmikrobiologie (Version: 05/2019)

Mit Unterstützung von Bund und Europäischer Union

Impressum

Für den Inhalt verantwortlich: Dr. Fernando Fernández Mendoza & Prof. Mag Dr. Martin Grube

Institut für Biologie, Bereich Pflanzenwissenschaften, Universität Graz, Holteigasse 6, 8010 Graz

Nationalpark Hohe Tauern, Kirchplatz 2, 9971 Matrei i.O.

Titelbild: Das Untersuchungsgebiet Innerschlöss (2350 m üNN) bei der Beprobung 2017. © Newesely

Zitiervorschlag: Fernández Mendoza, F. & Grube, M. (2019) Interdisziplinäres, integratives Monitoring- und Forschungsprogramm zur langfristigen, systematischen Ökosystembeobachtung im Nationalpark Hohe Tauern 2016-2019. - Modul 04: Mikrobiologie. Endbericht.

Unveröffentlichter wissenschaftlicher Bericht im Auftrag des Nationalparks Hohe Tauern.

http://www.parc.at/nph/mmd_fullentry.php?docu_id=38613

Graz am 17.05.2019

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
a. Ausgangssituation, Fragestellung	3
b. Zielsetzung	3
Projektpartner	3
Methodik	3
a. Beprobung	3
b. Umwelt-DNA Extraktion und Sequenzierung	4
c. Verarbeitung von ITS und 16S Amplicons	4
d. Datensatzzusammenstellung und -filterung	5
e. Statistische Analysen	6
f. Datenspeicherung und Verfügbarkeit	7
Ergebnisse	11
a. Sequenzierungsergebnisse	11
b. Ähnlichkeit der Zusammensetzung auf OTU Ebene	11
c. Taxonomische Zusammensetzung des Pilzdatensatzes	11
d. Struktur der Pilzgemeinschaften	12
e. OTU Reichhaltigkeit und Diversität im Pilzdatensatz	20
f. Modellierung der Pilzdiversität	20
g. Assoziationen im Pilzdatensatz	24
h. Taxonomische Zusammensetzung des Prokaryotendatensatzes	26
i. Struktur der Prokaryotengemeinschaften	26
j. OTU Reichhaltigkeit und Diversität im Prokaryotendatensatz	35
k. Modellierung der Prokaryotendiversität	35
l. Assoziationen im Prokaryotendatensatz	39
Interpretation und Diskussion	42
Ausblick	42
a. Aussagewert für das Testgebiet und Aussagewert für das gesamte Schutzgebiet	42
b. Einbettung in internationale Forschungsnetzwerke	43
Kosten-Analyse	43
Abbildungsverzeichnis	44
Literatur- und Quellenverzeichnis	47

Einleitung

a. Ausgangssituation, Fragestellung

Als eines der größten alpinen Schutzgebiete hat sich der Nationalpark Hohe Tauern vorgenommen, ein interdisziplinäres, integratives Monitoring- und Forschungsprogramm zur langfristigen Ökosystembeobachtung zu entwickeln und zu etablieren, das die systematische Beobachtung und Dokumentation der chemisch-physikalischen und biologischen Eigenschaften sowie die Entwicklung naturbelassener terrestrischer und aquatischer Ökosysteme über einen längeren Zeitraum anstrebt.

b. Zielsetzung

Ziel dieses wissenschaftlichen Pilot-Projektes ist die methodische Entwicklung, Ersteinrichtung und Validierung eines interdisziplinären, integrativen Monitoring- und Forschungsprogramms, welches in den relevanten Disziplinen im Rahmen von „Modulen“ (Teil-Projekten) abgewickelt werden soll. Der in diesem Projekt verfolgte Forschungsansatz ist in dieser Form neuartig und innovativ. Die Vernetzung der Untersuchungen aus unterschiedlichen Disziplinen im selben Untersuchungsgebiet, stellt einen neuartigen, integrativen Ansatz dar, der auf dieser inhaltlichen als auch räumlichen Skala noch nirgends umgesetzt wurde.

Ziel des Moduls 04 Bodenmikrobiologie war eine Erhebung der mikrobiellen Vielfalt der Monitoringflächen. Die mikrobielle Vielfalt bezieht sich in diesem Projekt auf die Bakterien (und teilweise miterfassten Archaeen, die manchmal auch als Urbakterien bekannt sind), sowie die Pilze. Die Diversität dieser Mikroorganismen wurde durch Verwendung von DNA-Sequenziermethoden festgestellt. Im Gegensatz zu früher verwendeten Methoden der Kultivierung ist es damit möglich auch die nicht-kultivierbaren Mikroorganismen im Boden zu erheben. Weil die überwiegende Mehrzahl der Mikroorganismen im Gefüge des Bodens mit anderen lebenden Organismen vergesellschaftet ist und somit nicht unter sterilen Bedingungen kultiviert werden kann, und weil die Kultivierungstechniken keine präzise Messung der Diversität erlauben, ist die DNA-Analyse zur Standardmethode für derartige Untersuchungen geworden.

In diesem Modul sollte weiters untersucht werden, ob sich in den Gradienten deutliche Unterschiede der mikrobiellen Vielfalt zeigen, bzw. ob derzeit Unterschiede in der Diversität zwischen den einzelnen Standorten des Monitoringprojektes zu finden sind. Erst die Weiterführung dieses Moduls über längere Zeiträume wird zeigen, inwieweit sich langfristige Veränderungen der mikrobiellen Vielfalt ergeben. Es ist anzunehmen, dass sich mit Veränderung der Vegetationsdecke bzw. Veränderungen des Wassergehaltes im Boden, bzw. anderer physikalisch-chemischer Bedingungen eine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung einstellen wird. Es ist daher in diesem Modul auch wichtig, die Daten in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Modulen (wie etwa der Bodenzöologie, Bodenphysik, und vor allem auch der Vegetationsanalyse) zu verstehen.

Projektpartner

In Modul 04 waren folgende Projektpartner involviert: Karl-Franzens-Universität-Graz, Institut für Biologie (AT): Dr. Fernando Fernández Mendoza & Prof. Mag Dr. Martin Grube. Wir haben die Probenahme in enger Kooperation mit den Kollegen Tappeiner/Newesely und Meyer durchgeführt. Dadurch wird es in Zukunft möglich sein, die Veränderungen der Organismengruppen in Beziehung zu setzen.

Methodik

Die beauftragten Arbeiten folgen den Richtlinien der von C. Körner konzipierten Präambel zum Manual (Körner 2019). In jedem der drei Nationalpark-Teile wurde 2016 eine Core site definiert, an der 3-6 permanent plots (Transekte, Dauerbeobachtungsflächen, DF) eingerichtet werden. Ein derartiger Transekt umfasst idealerweise drei aneinandergrenzende Streifen von etwa 10 m Länge und 1 m Breite, die Gradienten von pessimalen (Schneetälchen) bis zu optimalen Lebensbedingungen (voll entwickelter alpiner Rasen) darstellen. Der mittlere Streifen bleibt ungestört, die links und rechts angrenzenden Streifen dienen der invasiven Beprobung (Bodenmikrobiologie).

Die Standortsauswahl und Standortsvermarkung erfolgte in einer konzertierten Aktion durch die Arbeitsgruppen „Boden u. Biomasse“ (Körner, Tappeiner), „Vegetation“ (Wittmann), „Bodenmesofauna“ (Meyer) und „Bodenmikrobiologie“ (Grube). Die Vorgangsweise und vollständige Beschreibung des Probenahmeprotokolls ist im Handbuch wiedergegeben (Newesely, Tappeiner und Körner 2019).

a. Beprobung

Das Ziel der ersten Beprobung war dabei, eine Datengrundlage für spätere Wiederholungen im Sinne eines Langzeitmonitorings zu schaffen. Dazu wurde die gesamte DNA aus den Bodenproben extrahiert, um sie einer Sequenzanalyse zuzuführen. Mit den Sequenzdaten wurde auch versucht, geographische Trends des Bodenmikrobioms festzustellen, sowie Trends, die mit Unterschieden in Mikrohabitaten entlang eines topologischen Gradienten in den Beprobungsflächen korrelieren. Insgesamt wurden 45 Proben von den tiefen Anteilen der Transekte (T) gewonnen, 46 Proben wurden entlang der Transekte (M) entnommen und 50 an der oberen Kante der Transekte (K).

Die Proben entsprechend den Protokoll in Newesely, Tappeiner und Körner (2019) entnommen, an den gleichen Stellen, wo Bodenkernproben für die bodenphysikalischen und bodenzöologische Untersuchung entnommen wurden (siehe entsprechende Berichte). Die Proben repräsentierten die oberen (K), intermediären (M) und unteren Fraktionen der Transekte. Bodenkernproben wurden aus einer Tiefe von 3 cm unter der Erde gesammelt. Das Volumen von etwa 1,5 ml Erde wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße

überführt, eingefroren (-80 ° C) und mit einem TissueLyser II (Retsch, Qiagen, Wien) gemahlen, bevor die DNA-Extraktion mit dem Soil DNA Extraction Kit (Qiagen) erfolgte.

b. Umwelt-DNA Extraktion und Sequenzierung.

DNA wurde nach dem Herstellerprotokoll mit dem DNeasy PowerSoil Pro DNA Extraction Kit (Qiagen, Wien) gewonnen. Eine auf PCR-Amplifikaten basierende Sequenzierungsstrategie wurde für Bakterien und Pilze verwendet. Dafür wurden Genabschnitte herangezogen, die als Standard für die DNA basierte Klassifikation gelten. Die für die notwendige Vervielfältigung der DNA herangezogenen Primer zielten deshalb auf die variable Region der 16S ribosomalen RNA für Prokaryoten (Bakterien und Archaea) ab, während für Pilze die ITS2-Spacer-Region der ribosomalen RNA verwendet wurde (**Tabelle 1**). Für beide Zielgruppen wurde ein sogenanntes Nextera-Zwei-Schritt-PCR-Verfahren zur Bibliotheksvorbereitung verwendet (eine Bibliothek ist in diesem Zusammenhang eine Sammlung von DNA Stücken). Die DNA-Bibliotheken wurden vor der Sequenzierung gereinigt und in gleicher Konzentration zusammengestellt. Die Sequenzierung wurde auf einer Illumina MiSeq-Plattform unter Verwendung von v2-Chemie und gepaarten 250-bp-Endläufen durchgeführt. Die Vorbereitung der Amplikon-Bibliothek, die Sequenzierung sowie das Trimmen und Adaptieren von Adaptoren wurde von Microsynth GMBH, Schweiz, durchgeführt.

c. Verarbeitung von ITS und 16S Amplicons

Die Daten wurden unter Verwendung einer für das Projekt spezifischen Analyseabfolge (Bioinformatik-Pipeline) verarbeitet, die es ermöglicht, die mikrobiellen Gemeinschaften in einem ökologischen Ansatz zu analysieren. Die mikrobiellen Gemeinschaften werden dabei durch ihre Zusammensetzung aus sogenannten operationellen taxonomischen Einheiten (OTU) wiedergegeben. Die operationellen taxonomischen Einheiten (OTU) widerspiegeln dabei gewissermaßen die mikrobiellen Arten auf der Basis der Sequenzähnlichkeit, da andere Möglichkeiten der Artenabgrenzung fehlen.

Die rohen Sequenzierungsdateien wurden zuerst von der Firma vorgenommen, an die der technische Sequenzierungsvorgang extern vergeben wurde (Microsynth GmbH). Dort wurden auch zusätzlich das Demultiplexing (Aussortieren der Sequenzen verschiedener Proben) und Adaptor-Trimmen mit cutadapt v1.14 (Martin 2011) durchgeführt. Diese Adaptoren (kurze Sequenzabschnitte) sind eine technische Notwendigkeit für das Sequenzieren, aber diese Information ist bei der weiterführenden Analyse störend und wird daher entfernt. Als Ergebnis erhielten wir eine hohe Anzahl an aus den Proben insgesamt abgelesenen Sequenzen, in unserem Fall mehr als 54 Millionen Rohsequenzen. Die Analyse dieser Menge umfasst eine sehr rechnerintensive Nachbearbeitung und daran anschließende statistische Analyse.

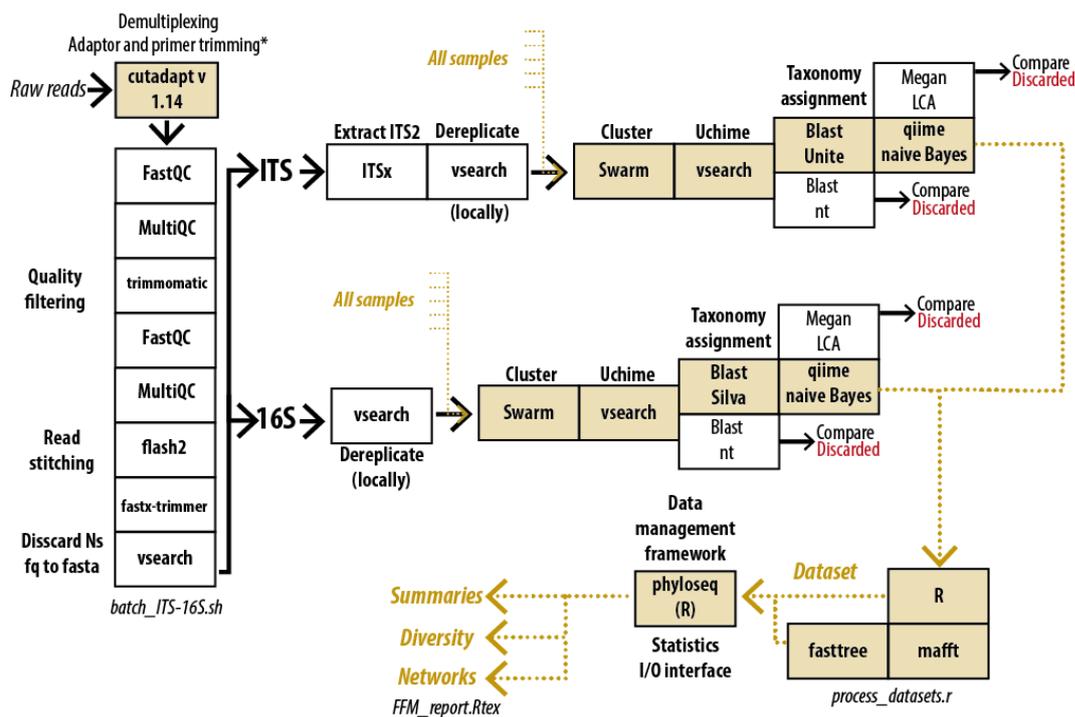


Abbildung 1. Schematische Darstellung der bioinformatischen Analyseabfolge (Analytic Pipeline), die für dieses Projekt eigens entwickelt wurde. Dateien, auf die jeweils ein Dateiname verweist, sind online verfügbar in einem dafür vorgesehenen öffentlich zugreifbaren gitHub-Repository. Der Hauptpfad der Verarbeitung, der für die Verarbeitung aller Proben gemeinsam gilt, ist farblich hervorgehoben. Namen in Kursivschrift markieren die wichtigsten resultierenden Datenstrukturen. Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung, Demultiplexierung und Trimmen der Adaptorsequenzen wurden von Microsynth GmbH durchgeführt.

Abbildung 1 zeigt die Analyseabfolge in der Übersicht. Die demultiplexierten Sequenzdateien wurden zur Qualitätskontrolle mit FastQC untersucht (Andrew 2010). MultiQC (Ewels et al. 2016) wurde verwendet, um eine breitere kontextuelle Sicht auf mögliche Sequenzierungsfehler und deren Auswirkungen auf die Qualität des Datensatzes zu erhalten. Trimmomatic wurde zum Reinigen von Adaptorsequenzen und zum Trimmen der Qualität der Sequenzbibliotheken (paired end libraries; Bolger, Lohse, and

Usadel 2014) verwendet. Später wurden die komplementären Sequenzen der Bibliotheken mit flash2 (Magoč and Salzberg 2011) zusammengefügt. Nach einer zweiten Qualitätsuntersuchung mit fastqc und multiqc wurde fastx-trimmer (Hannon-lab 2018) zur weiteren Reinigung der zusammengesetzten Datensätze verwendet. Weiteres wurde Vsearch (Rognes et al. 2016) verwendet, um Sequenzen mit mehrdeutigen Nukleotidzuordnungen (Ns) zu verwerfen, in fasta umzuwandeln und schließlich den Samples zuzuordnen (demultiplexieren). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden ITS- und 16S-Amplicons auf ähnliche Weise verarbeitet, jedoch wurden ITS-Amplicons vor ihrer Dereplikation in Vsearch mit ITSx (Bengtsson-Palme et al. 2013) verarbeitet, um Nicht-Pilz-Sequenzen auszuschließen und um die 5.8S- und LSU-Fraktionen auszuschließen, sowie spezifische ITS II-Spacerregion.

Nach der Dereplikation wurden alle Beispieldateien zusammengefasst, nach Größe (Anzahl der Replikate) in Vsearch sortiert und mit einem im Programm Swarm implementierten rekursiven Algorithmus gruppiert (Mahé et al. 2014). Nach diesem Clustering von Sequenzen wurde Vsearch erneut verwendet, um potentielle Sequenz-Chimären zu detektieren, basierend auf der pro OTU geschätzten repräsentativen Sequenzen und unter Verwendung des UChime-Algorithmus (Edgar et al. 2011; Edgar 2016). Parallel dazu wurden alle Amplicons mit Blastn 2.2.30 (Zhang et al. 2000) mit einer lokale Kopie der Silva 16S Datenbank (Pruesse et al. 2007; Quast, Pruesse, et al. 2013) und der UNITE Pilz ITS Datenbank (Abarenkov et al. 2010; Nilsson et al. 2019, 2013) verglichen und taxonomisch zugeordnet. In diesem ersten Suchdurchlauf wurden die Ausgabedateien mit Megan v.5.10.2 (Huson, Mitra, and Ruscheweyh 2011) stapelweise verarbeitet, um rohe taxonomische Profile zu generieren. Bei der letzten Wiederholung der Verarbeitung wurde jedoch der in Qiime2 (Caporaso et al. 2010) enthaltene Sci-Kit-Klassifikator (Bokulich et al. 2018) für die Zuordnung verwendet.

Tabelle 1. Primer für die PCR-Amplifikation von Bakterien- und Pilzgemeinschaften in den Bodenproben.

Primer Namen	Primersequenz (5'-3')	Zielregionen	Sequenzlänge (bp)	Literatur
341F_ill 802R_ill	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	V3 and V4	460	(Quast, Klindworth, et al. 2013)
ITS3 ITS4	GCATCGATGAAGAACGCAGC TCCTCCGCTATTGATATGC	ITS2	300-400	(White et al. 1990)

d. Datensatzzusammenstellung und -filterung

Die ausgegebenen Daten wurde in das Programm R importiert (R Development Core Team 2018) mit dem sie in Tabellenform gebracht und gefiltert wurden. Wir gingen von einem tabellarischen File aus (.csv) der die Sample-kodierung, sowie die Transekt- und Lokalitäteninformation enthielt, denen die Sequenzierungsergebnisse beigefügt wurden. In einem zweiten Schritt lasen wir die dereplizierten Sequenzfile der Samples für jede sequenzierte Genregion (Named as All_samples in Figure 1) in das R Programm ein, mittels der read.dna Funktion des ape Pakets (Paradis, Claude, and Strimmer 2004). Die Sequenznamen pro Lokalität wurden extrahiert, in Tabellenform gebracht und verarbeitet um zur Abbildung der weiteren Ergebnisse eine Datengrundstruktur zu erhalten. Danach wurden die Ergebnisse der Swarm output files analysiert, um Cluster der genetischen Ähnlichkeiten (OTU) zu finden, denen die dereplizierten Sequenzen zugeordnet werden können. Wegen der großen Zahl der OTUs wurde die Zuordnung der Ergebnisse aus der Swarm Analyse zu den Sample Files eine sehr zeitaufwändige und computerintensive Angelegenheit. Danach wurden die Resultate der Chimärenanalyse berücksichtigt, bevor die taxonomischen Zuordnungen gemacht wurden. In Tabellenform wurden sie dann (als .tsv File) aus dem Programm Qiime exportiert. Nachdem alle Datenfiles in einen gemeinsamen Datenrahmen für jeden Genort gebracht wurden, wurden die OTUs ausgefiltert (nach chimärischem Ursprung und taxonomischer Zuordnung). Alle OTUs, die chimärischen Ursprungs waren oder die in irgendeiner Weise unklar waren, wurden aus dem Datensatz ausgefiltert, ebenso wie OTUs die nicht-bakteriell oder nicht-archaeal waren im 16S Datensatz oder nicht-pilzlich im ITS Datensatz. Außerdem wurden alle OTUs ausgeschlossen, die durch weniger als 50 Sequenzen in den Samples vertreten waren.

Schließlich wurden gefilterte OTU- und Taxonomietabellen in phyloseq-S4-Objekte (McMurdie und Holmes 2013) umgewandelt, um sie weiter zu analysieren. Um einen dafür notwendigen phylogenetischen Baum zu erstellen, stellten wir die Sequenzen in eine Tabelle homologer Sequenzpositionen zusammen (=DNA-Alignment) mithilfe des Programms MAFFT (S. Katoh 2013; K. Katoh et al. 2002) und berechneten mit diesen Daten eine maximum likelihood (=ML) Phylogenie mithilfe des Programms Fasttree (Price, Dehal, and Arkin 2010), die nun in die 16S phyloseq object Datenstruktur integriert wurde. Sobald solche Strukturen zusammengestellt sind, kann man mit ihnen den Datensatz aus verschiedenen Perspektiven visualisieren (etwa nach Samples oder OTUs). Zuerst wurden dann jene Samples aus dem Datensatz herausgenommen, die zu schlecht sequenziert wurden, und dann wurden unterrepräsentierte OTUs (sogenannte Singletons) herausgefiltert, die eine vergleichende Analyse erschweren.

Der Pilzdatensatz wurde, was die Sequenzausbeute betrifft, ziemlich heterogen sequenziert. Das weist darauf hin, dass es schwierig es ist, ein ausreichend äquimolares Pooling der Samples zu bekommen, wenn die DNA-Fragmente deutlich unterschiedliche Größen besitzen. Dies war jedoch beim Pilzdatensatz so zu erwarten, denn die verschiedenen Pilzgruppen können aus unterschiedlichen Gründen deutliche Sequenzlängenunterschiede aufweisen. Die einzige Alternative dazu wäre andere Genorte (nicht von ribosomalen RNA Genen) heranzuziehen. Diese haben jedoch den entscheidenden Nachteil, dass die Vergleichs-Datenbanken solche Genorte für die Pilze nur unvollständig erfasst haben. Die Pilze unterscheiden sich überdies auch deutlich darin, wie leicht man von diesen Genorten überhaupt Sequenzdaten bekommt. Wir würden daher bei der Wahl eines anderen Genortes ein erhebliches Risiko eingehen, einen systematischen Fehler in der Erfassung der Vielfalt riskieren. Insgesamt sind aber die meisten sehr gut sequenziert worden, und im Vergleich mit vielen anderen Sequenzierprojekten war das Projekt diesbezüglich sehr erfolgreich. Nur 6 Samples mussten ausgeschlossen werden, weil daraus zu wenige Sequenzen für einen Vergleich gewonnen werden konnten (siehe orange Samples in Abbildung 2): vier Samples aus UN und zwei von IN; eines von der Kopfzeile des Transekts (K), zwei aus dem mittleren Bereich (M) und zwei von der Tiefzeile (T).



Die Einzigartigkeit der OTUs wurde auch für das weitere Ausfiltern berücksichtigt. Der Pilzdatensatz (ITS) zeigte eine starke bimodale Verteilung der Häufigkeiten, bei der manche seltenen OTUs konsistent untersequenziert wurden und nur in wenigen Samples gefunden wurde, während die meisten anderen OTUs zu einer mehr oder weniger kontinuierlichen Verteilung der Spezifität vs. Repräsentanz in den Samples gehörten. Die meisten OTUs sind ähnlich gut vertreten und ihre Repräsentanz folgt näherungsweise einem logarithmischen Verhältnis zur Anzahl der Samples in denen die OTUs vertreten sind. Die überwiegende Zahl der pilzlichen OTUs wurden jeweils in wenigen Samples gefunden (Medianwert ca. 3 samples), während es eine signifikante Anzahl an OTUs gibt, die im gesamten Datensatz durchgehend vertreten waren. Um den Einfluss von unterrepräsentierten OTUs auf die Auswertung zu vermeiden, schlossen wir solche aus, die nur in einem Sample vorhanden waren und auch solche, die sonst nur mit weniger als 300 Sequenzreads auftraten. Dadurch wollten wir Fehler durch Kontaminationen und die nicht-informativen OTUs der unteren modalen Elemente der Dichteverteilung in

Abbildung 4 vermeiden.

Demgegenüber weiste der Prokaryotendatensatz (16S), der Bakterien und eine Reihe von Archäen (früher “Urbakterien”) umfasst, eine ziemlich homogene Sequenzierdichte auf, mit Ausnahme eines Samples (IG4A2A), das wegen zu geringer Zahl an reads von der Analyse ausgeschlossen werden musste (Abbildung 5). Das Herausfiltern nicht-informativer OTUs wurde ganz gleich wie für den Pilzdatensatz vorgenommen, jedoch haben wir hier feinere Kriterien angewendet und außer den nur in einem Sample auftretenden OTUs solche mit weniger als 100 reads ausgeschlossen (Abbildung 6). Die Gesamtgröße der Datensätze vor und nach der Filterung ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2. Größe des Datensatzes vor und nach der Datenfilterung.

Dataset	Filterung	Samples	OTUs	Reads
ITS	ungefiltert	84	3115	16.937931 Millionen
	gefiltert	78	2813	16.608615 Millionen
16S	ungefiltert	84	47727	37.753578 Millionen
	gefiltert	83	27056	37.721765 Millionen

e. Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen und Datenmanipulationen wurden in R v. 3.4.2 durchgeführt. Dabei wurden hauptsächlich Ressourcen von Bioconductor (Huber et al. 2015) verwendet, d.h. das Paket phyloseq (McMurdie und Holmes 2013), vegan (Oksanen et al. 2019) und lme4 verwendet (Bates et al. 2015).

Phyloseq-Objekte bieten eine umfassende Beschreibung des Datensatzes und lassen sich leicht verarbeiten, um taxonomische Muster und statistische Zusammenfassungen auf unterschiedliche Weise zu untersuchen. Angesichts der Dichte der Daten, die mit Amplicon-Sequenzierungsmethoden gewonnen werden, kann die Interpretation mikrobiologischer Gemeinschaften unter verschiedenen Perspektiven erfolgen. Bei dieser Untersuchung haben wir die Interpretation der ökologischen Unterschiede zwischen Proben, die die Verschiedenheit in der Zusammensetzung der OTU messen, vorrangig behandelt. Die Entscheidung dafür, die *a priori* getroffen wurde, prägte alle methodologischen Aspekte dieser Studie. Es sind auch mehrere andere Ansätze möglich und sinnvoll, insbesondere solche, die rein taxonomische Einheiten als OTUs verwenden, und solche, die auf der Interpretation von Mustern phylogenetischer Unähnlichkeit anhand gewichteter oder ungewichteter UniFrac-Abstände basieren (Lozupone und Knight 2005; Lozupone et al. 2010; Chang, Luan und Sun 2011).

Die ökologische Ähnlichkeit mikrobiotischer Gemeinschaften, die oft als Beta-Diversität in Mikrobiomstudien interpretiert wird, wurde mittels Ordinierungsmethoden von Distanzmatrizen der mikrobiellen Zusammensetzung untersucht (Faith, Minchin, and Belbin 1987). Wir bevorzugten den semimetrischen Bray-Curtis Index (Legendre and Legendre 2012) für die Unterschiedlichkeit der Zusammensetzungen und nonmetric multidimensional scaling (NMDS; Kruskal 1964b, 1964a) für die Ordination. Trotz der vergleichbaren Dichte des Samplings verwendeten wir normalisierte Werte für die Ordination, weil schon kleine Abweichungen der numerischen Unterschiede hier zu einer inflationären Divergenz der Resultate münden.

Die Bray-Curtis Distanz Metrik ist eine übliche Wahl für DNA-Metabarcoding Untersuchungen, wie sie auch hier vorgenommen wurden. Sie verlangt weniger Rechenaufwand als einige modernere Methoden (Cao, Williams, and Bark 1997), ist weniger beeinflusst



von der Abwesenheit häufiger OTUs und kann gut zwischen unterschiedlichen Gründen der Variation unterscheiden (etwa durch seltene und häufig OTUs oder unterschiedlich skalierte Variation in der OTU Repräsentanz; Cao, Williams, and Bark 1997). In Bezug auf die Ordination, liefert NMDS, analog zur MDS (multidimensional scaling, PcoA), eine robuste und uneingeschränkte Ordination (Minchin 1987). Ihre iterative Implementation in der function *metaMDS* (implementiert in *vegan*) hat den Vorteil, dass das Problem lokaler Effekte bei der Optimierung vermieden wird.

Während die ITS Sequenzen der Pilze schon bei geringen taxonomischen Unterschieden stark divergieren kann, behält der für Prokaryoten verwendete DNA-Barcode (SSUrRNA Gene) eine signifikante Homologie über die gesamte Diversität bei. Das erlaubte uns phylogenetische Verwandtschaft in die Distanzmaße einzubinden. Für diesen Zweck verwendeten wir die gewichteten und normalisierten UniFrac dissimilarity Scores (Lozupone et al. 2010; Chang, Luan, and Sun 2011; Lozupone and Knight 2005), anstelle einer DPCoA Auswertung, die hier eine mögliche Alternative wäre. Prinzipiell würden UniFrac Distanzwerte auch die Verwendung von NMDS (nichtmetrische multidimensionale Skalierung) für ein Clustering ermöglichen, aber wegen der Einschränkungen der phyloseq Implementation und mangels Konvergenz bei Darstellungen mit zwei Achsen, präsentieren wir unsere Gruppierungen basierend auf parametrischer PcoA (MDS).

Die Alphadiversität pro Sample wurde mit der *phyloseq* wrapperfunktion *plot_richness* untersucht, wobei zuerst *raw OTU richness* (Observed) sowie zwei weitere, rarefizierungsbasierte Richness-Werte ermittelt wurden (Chao1 and ACE), und dann ebenfalls alternative Diversitätsindices, die nicht nur Richness sondern auch Evenness der OTU Verteilung in Betracht ziehen (Shannon, Simpson und InvSimpson). Obwohl es wenig Einfluss auf die Ordinationsergebnisse (die wegen der Verwendung einer Distanzmatrix gepuffert waren) hatte wenn die Daten nicht normalisiert wurden, sind die Alphadiversitätswerte dann stark gestört wenn es Unterschiede zwischen den Samples bezügl. der Repräsentanz an OTUs gibt. Dieser Effekt wirkte sich besonders im 16S Datensatz aus, der eine weit höhere Gesamtzahl an OTUs aufwies (Tabelle 2).

Für die Diversitätswerte entschieden wir uns gegen normalisierte Prozentwerte oder normalisierte Pseudoreads, die unkontrollierte, numerische Fehler einführen würden. Vielmehr verwendeten wir die ursprünglichen Rohwerte aus der Sequenzierung. Um die Fehler zu vermeiden, die sich aus einer ungleichen Datendichte in den Samples ergeben können, gingen wir folgendermaßen vor. Auf der Ebene der Beschreibung einzelner Samples, bevorzugten wir rarefizierende Wertermittlungen (Chao1 and ACE), damit eine gemeinhin vergleichbare Grundlage für den Vergleich entsteht.

Bei der Modellierung von Unterschieden in der Diversität entlang der beobachteten Gradienten schlossen wir die Samplingintensität (= Gesamtzahl der Sequenzauslesungen pro Sample) als eine Kovariate im Rahmen eines mixed effect Modells ein. Die Verwendung eines solchen mixed effects Modells erlaubte uns, den Faktor Lokalität als Zufallseffekt zu kontrollieren. Lineare mixed effect Modells wurden in der Function *lmer* of R package *lme4* verwendet (Bates et al. 2015). Um die Signifikanz des ökologischen Gradienten auf die Resultate zu überprüfen, verwendeten wir Anova Tests, bei denen Samplingintensität (Zahl der Sequenzen) und Lokalität als random effects in ein komplettes Modell einbezogen wurden. Bevor wir die linearen Modelle berechneten, verwendeten wir den Shapiro-Wilk Test, um die Normalverteilung der richness über die Samples und der Diversitätswerte zu prüfen, Bartlett's Test um die Varianzhomogenität zu kontrollieren (Heteroskedastizität) und Wilcoxon's Rangsummentest, um einen ersten (nicht-direktionalen) Eindruck von der Unterschiedlichkeit der ermittelten Werte zwischen den verschiedenen Positionen im Gradienten zu gewinnen.

Wir verwendeten den methodologischen Rahmen von edgeR im Bioconductor Programmpaket (Robinson, Mccarthy, and Smyth 2010), der auf negativen binomischen Modellen beruht, um die differentielle Abundanz von OTUs und unterschiedliche taxonomische Gruppen zwischen den verschiedenen Teilen im Gradienten zu studieren (McMurdie and Holmes 2014). Diese Methoden wurden als Teil des *Bioconductor* Pakets *PathoStat* weiterentwickelt, aber wir verwendeten eine modifizierte Version der Zusatzskripts in *phyloseq*, die unter folgender Adresse bereitgestellt sind: <https://joey711.github.io/phyloseq-extensions/edgeR.html>.

Ausgehend von den phyloseq Objekten erhielten wir mit der *transform_sample_counts* Funktion normalisierte OTU-Matrizen. Sie wurden dann mit der Funktion *phyloseq_to_edgeR* umgewandelt, bei der *calcNormFactors* für die Normalisierung von Faktoren mittels der *relative log expression* (RLE) Methode angewendet wurde (Anders, S; Huber 2010). Die gemeinsame, tendenzielle und abhängige Dispersion (McCarthy, Chen, and Smyth 2012) der OTUs des Datensatzes wurde als eine negativ binomiale Likelihood ermittelt, wie sie in der Funktionen *estimateDisp* implementiert ist. Die Unterschiede in den Abundanz zwischen oberen und unteren Anteilen des Gradienten wurde mit der *exactTest* berechnet. Die Ergebnisse des exakten Tests wurden mit *topTags* Funktion visualisiert. Diese Methode zur Ermittlung der differentiellen Abundanz sind verhältnismäßig einfach. Sie könnten bei Bedarf erweitert werden und dann auch lineare Modelle implementieren, und damit auch die Entwicklung einer Zeitreihe untersuchen. Das könnte mittelfristig für die Langzeituntersuchung relevant werden.

f. Datenspeicherung und Verfügbarkeit

Die Rohdaten und die Datenmatrizen der Verarbeitung werden auf einer Festplatte hinterlegt. Alle Befehls-Scripts der Verarbeitung und statistischen Analyse werden ebenfalls darauf verfügbar gemacht. Sie fließen auch als Anhang zum methodologischen Handbuch ein.

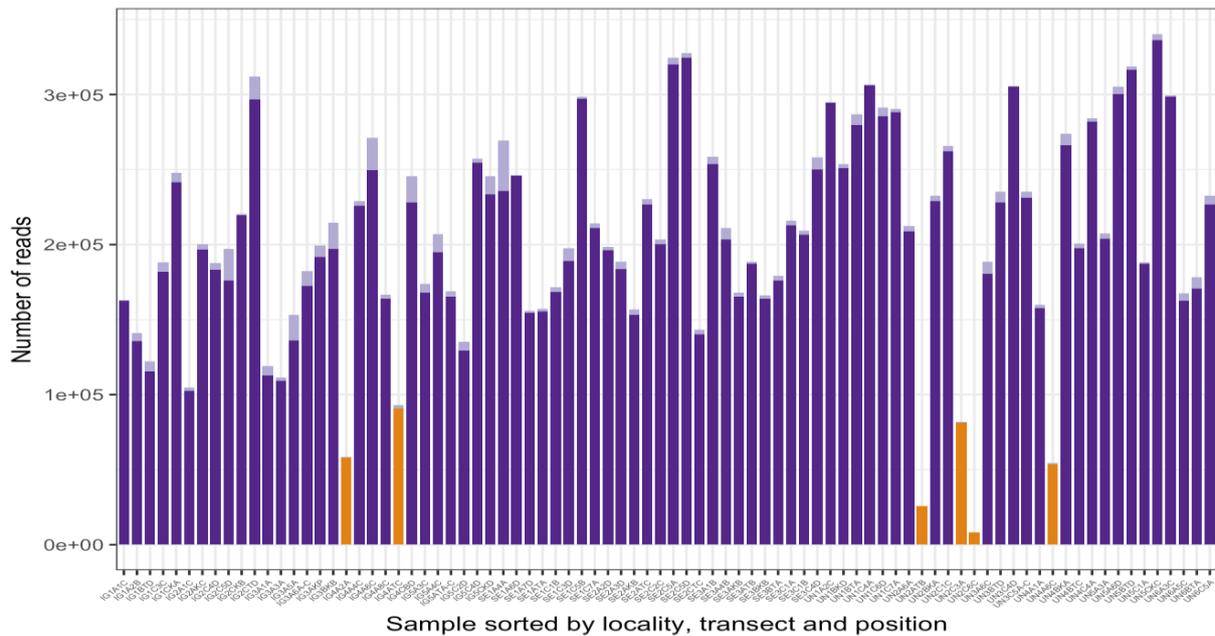


Abbildung 2. Amplicon Sequenzierung der ITS Genregion von Pilzen. Sequenzierdichte der Samples. Die Säulenhöhen zeigen die Anzahl der Sequenzablesungen, hell gefärbte Fraktionen sind chimärische Ablesungen, die von einer weiteren Analyse ausgenommen werden mussten. Orange unterlegte Säulen sind unterrepräsentierte Samples die für die statistische Analyse ungeeignet waren (vier Samples von UN und zwei von IN; eines von einem Transekt-Kopf (K), zwei von der mittleren Region (M) und drei von Transekt-Tief (T)).

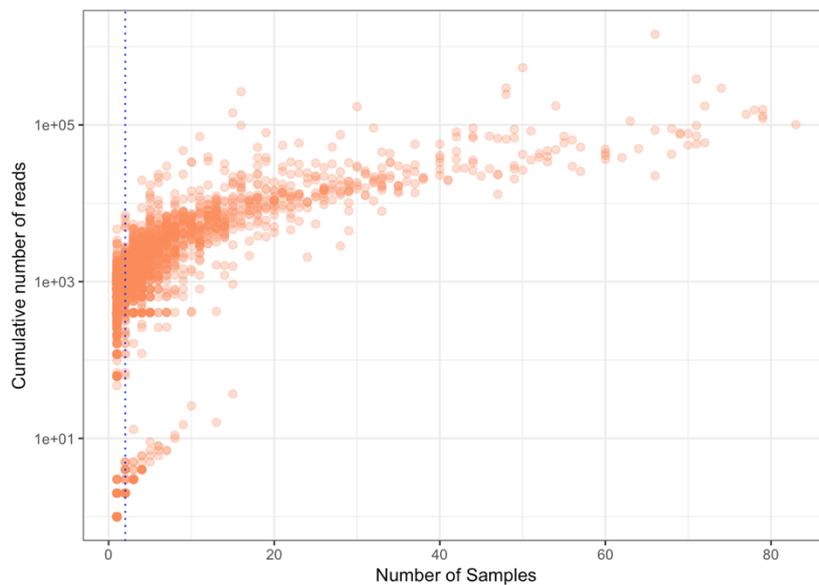


Abbildung 3. Einzigartigkeit der OTUs in der ITS Datenmatrix (chimärische Sequenzen sind ausgeschlossen). Jeder Punkt ist ein OTU entsprechend seiner Gesamtgröße (Gesamtzahl der Ablesungen in allen Samples) und die Zahl der Samples in welchem das OTU repräsentiert war. Die blau strichlierte Linie gibt den Medianwert der Samples in dem einzelne OTUs gefunden wurden.

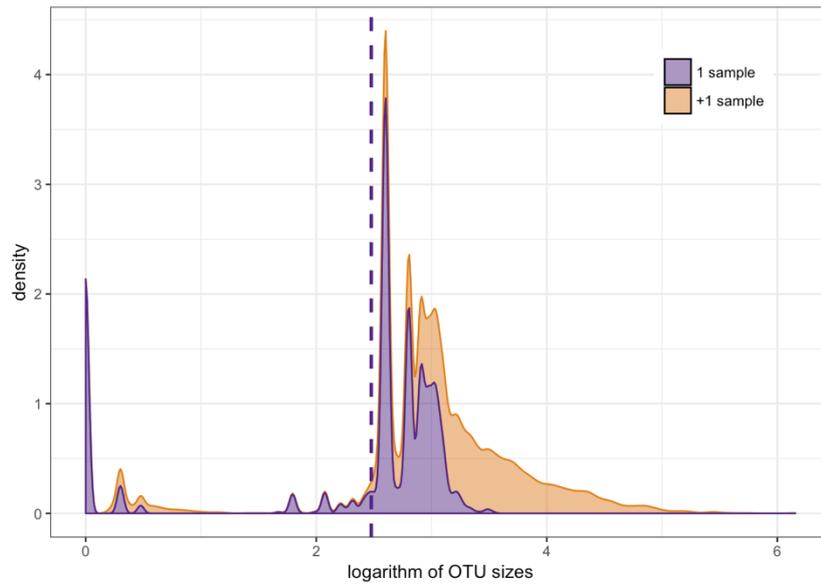


Abbildung 4. Gestapelte Dichtepprofile der Sequenztiefe pro OTU im ITS Datensatz. Die Farbcodes trennen OTUs die nur in einem Sample gefunden wurden von jenen die häufiger auftraten.

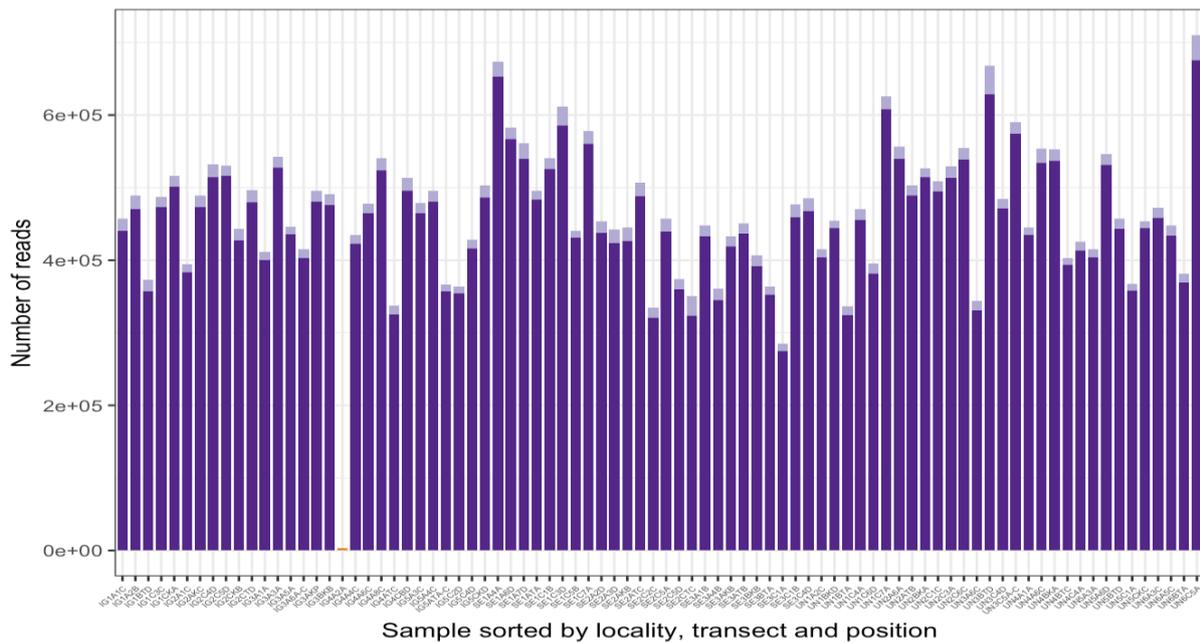


Abbildung 5. Ampliconsequenzierung der variablen 16S rRNA Genregion von Bakterien. Sequenzierdichte der Samples. Die Säulenhöhen zeigen die Anzahl der Sequenzablesungen, hell gefärbte Fraktionen sind chimärische Ablesungen, die von einer weiteren Analyse ausgenommen werden mussten. Orange unterlegte Säulen sind unterrepräsentierte Samples die für die statistische Analyse ungeeignet waren (ein Sample von IN und einer von OB).

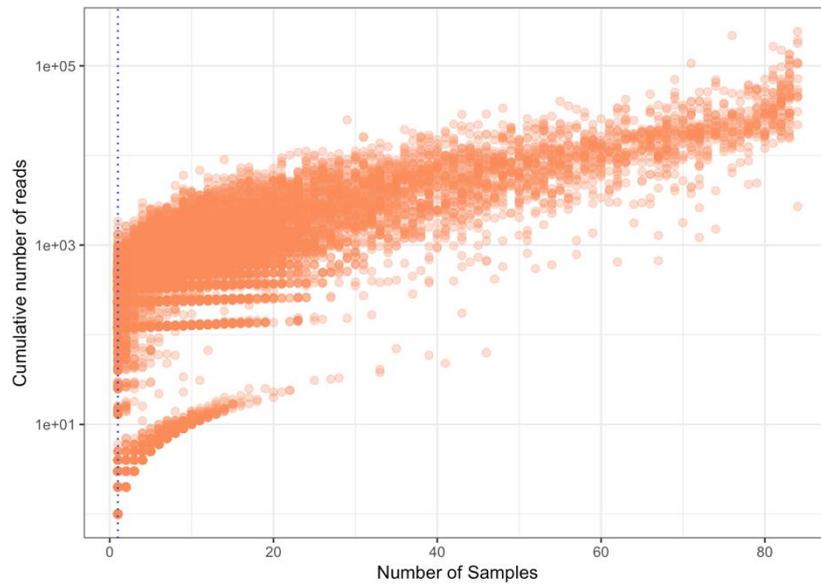


Abbildung 6. Einzigartigkeit der OTUs in der 16S Datenmatrix (chimerische Sequenzen sind ausgeschlossen). Jeder Punkt ist ein OTU entsprechend seiner Gesamtgröße (Gesamtzahl der Ablesungen in allen Samples) und die Zahl der Samples in welchem das OTU repräsentiert war. Die blau strichlierte Linie gibt den Medianwert der Samples, in dem die einzelnen OTUs gefunden wurden.

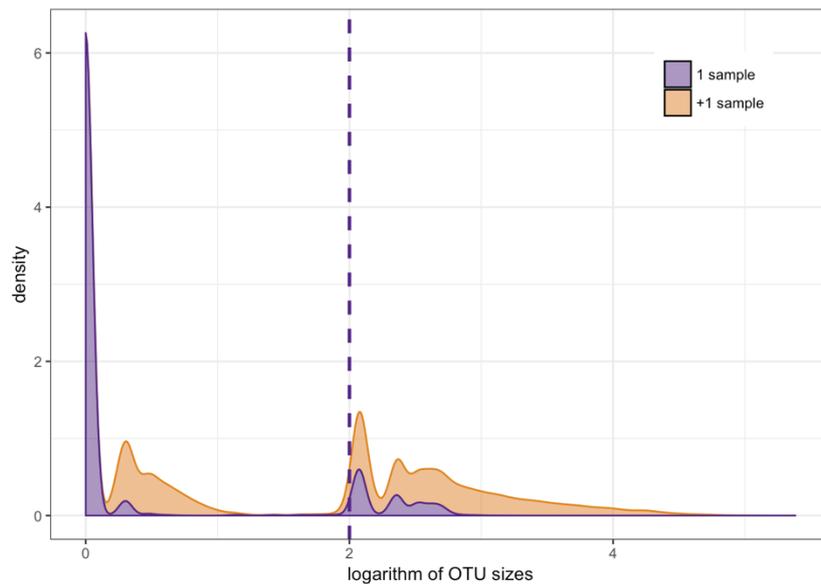


Abbildung 7. Gestapelte Dichteprofile der Sequenztiefe pro OTU im Prokaryoten-Datensatz. Die Farbcodes trennen OTUs, die nur in einem Sample gefunden wurden, von jenen die häufiger auftraten.



Ergebnisse

a. Sequenzierungsergebnisse

Aus den ungefilterten Datensätzen schlossen wir zunächst Samples aus, die deutlich untersequenziert waren (d.h. wo zu wenige Sequenzen abgelesen wurden), genauer gesagt solche, die weniger 10^5 reads aufwiesen. Sechs samples wurden deshalb beim pilzlichen (ITS) Datensatz (IG4A2A, IG4ATC, UN2ATB, UN2C3A, UN2C6C, UN4A6C) (Abbildung 2) und ein Sample für den prokaryotischen (16S) Datensatz (IG4A2A, Abbildung 5) nicht für weitere Analysen berücksichtigt. Alle OTUs die als Sequenz-chimären identifiziert wurden oder aus anderen Gründen zweifelhaft waren, wurden systematisch ausgeschlossen. Sequenz-chimären treten zu einem geringen Anteil beim Amplifizierungsvorgang der DNA Fragmente auf. Für die nachfolgenden Analysen werden untersequenzierte oder solche, die nur in einem Sample gefunden wurden ausgesondert. Der Schwellenwert richtete sich dabei nach Profilen der Sequenziertiefe: für den Pilzdatensatz wurde ein Schwellenwert von 300 reads gewählt (Abbildungen 3,4), und für den Prokaryotendatensatz 100 reads (Abbildungen 6,7). Ausserdem wurden Sequenzen, die den Chloroplasten von Pflanzen zugeordnet wurden, ebenfalls ausgeschlossen.

Das Ausfiltern bedeutet eine Verringerung der Anzahl von OTUs, bei minimaler Reduktion der Gesamtzahl der Reads. Das Filtern ist in solchen Analysen notwendig, damit die nachfolgenden Analysen zu vernünftigen Ergebnissen führen. Im Pilzdatensatz wurden etwa 10% der gesamten nicht-chimären OTUs herausgefiltert, was aber nur eine Reduktion von 2% aller Sequenz-reads bedeutete. Im Prokaryotendatensatz ist das noch deutlicher. Hier hat ein Ausfiltern von 0.08% der Reads zu einer 43%-igen Verringerung der Anzahl von OTUs geführt (Tabelle 2).

b. Ähnlichkeit der Zusammensetzung auf OTU Ebene

Sowohl pilzliche als auch bakterielle Datensätze weisen ein hohes Maß an Ähnlichkeit auf, wobei ein großer Anteil der OTUs über die Standorte hinweg geteilt wird. Dieses Muster untermauert die Vorstellung, dass trotz der großen taxonomischen Varianz in mikrobiologischen Stichproben alle Stichproben eine Teilstichprobe eines gemeinsamen Pools darstellen. Die Dominanz einer gemeinsamen Menge von OTUs, die über die Lokalitäten verteilt sind, ist im bakteriellen Datensatz stark ausgeprägt, wo auch ein erheblicher Teil der Diversität, die nur für einzelne Samples gilt, durch Filterung entfernt wurde. Die Venn-Diagramme der Abbildung 8 repräsentieren das Muster gemeinsamer und exklusiver OTUs zwischen Regionen und zwischen den verschiedenen Anteilen des Transekts in allen Lokalitäten.

Die dargestellten Werte legen nahe, dass die Lokalität der Stichproben für die Zusammensetzung der Gemeinschaften eine stärkere Rolle spielt als die Position im Transekt. Interessanterweise gibt es, obwohl der obere Teil des Gradienten eine größere Anzahl exklusiver OTUs aufweist, keine eindeutige Richtungsabhängigkeit, wenn die paarweise Aufteilung von OTUs berücksichtigt wird. Die größere Anzahl der exklusiven OTUs könnte sich aus der höheren Komplexität der Vegetation gegen die optimalen Gradienten erklären. Das zu prüfen würde jedoch noch weitere Untersuchungen erfordern, bei denen auch die Rhizosphärengemeinschaften einzelner Pflanzen gesondert untersucht werden sollte.

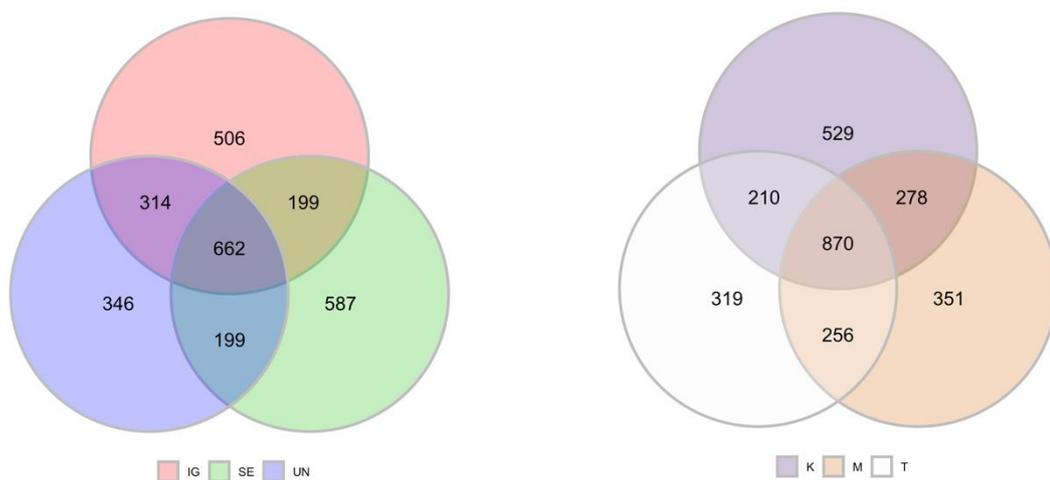


Abbildung 8. Pilz-Datensatz (ITS Sequenzen). Anzahl gemeinsamer und exklusiver OTUs in den drei besammelten Lokalitäten (links) und in den drei Transekten aller Lokalitäten (rechts).

c. Taxonomische Zusammensetzung des Pilzdatensatzes

Die taxonomischen Hauptmuster des Pilzdatensatzes sind in Abbildungen 9–15 and Tabelle 3 zusammengefasst. Die taxonomische Zuordnung an jeder Lokalität ist im online-Supplement wiedergegeben. Taxonomische Daten, die durch den Vergleich der DNA Sequenzen mit Referenzdatenbanken gewonnen werden liefern uns wichtige Zusammenhänge der übergreifenden Muster der mikrobiellen Gemeinschaften. Dabei ist der Wert dieser Vergleiche ganz klar davon abhängig, welche Sequenziertechnologie verwendet wurde und wie gut die Vergleichsdatenbanken aufgebaut sind. Solche international verwendeten Referenzdatenbanken,

und die Datenbank UNITE insbesondere (Abarenkov et al. 2010; Nilsson et al. 2019, 2013), sind nach wie vor einer laufenden Verbesserung unterworfen, die sich auch auf die Mitarbeit der internationalen Forschungsgemeinschaft stützt. Auf jeden Fall können die Datenbanken, wenngleich sie schon sehr gut gefüllt sind, damit kein vollständiges Bild der mikrobiellen Diversität garantieren. Wir sind deshalb auch davon überzeugt, dass eine revidierte Analyse in der Zukunft, die hier vorliegenden Analysen noch bis zu einem gewissen Ausmaß verbessern kann.

Der Pilzdatensatz beinhaltet eine Fraktion an Sequenzen, die nicht klar taxonomischen Kategorien zugeordnet werden können. Die große Zahl an noch nicht-identifizierbaren Pilzen mag mit zwei Faktoren zusammenhängen. Zum einen enthalten Bodengemeinschaften eine hochdiverse Gemeinschaft von Mikropilzen, von denen viele an kleinräumige trophische Nischen angepasst sind und die bislang kaum kultiviert werden konnten. Andererseits hat sich die UNITE Datenbank primär auf Mykorrhizapilze konzentriert, und daher sind Pilze mit anderen ökologischen Strategien weniger gut repräsentiert. Die verhältnismäßig niedere Identifizierungsquote betrifft nicht nur Pilze, die offenbar selten im Datensatz auftraten, sondern auch solche, die besonders häufig vorkommen. Von den Top 40 der repräsentierten OTUs der Tabelle 3 sind sechs nur auf dem Niveau des Organismenreichs oder der Abteilung mithilfe der Referenzdatenbank zuordenbar. An dieser Stelle muss aber auch gesagt werden, dass es gegenwärtig zur UNITE Datenbank keine Alternative gibt.

Insgesamt dominieren im Pilzdatensatz mehrere Gruppen von Pilzen die feinkalierte Nischen in der Umwelt besetzen. Die erste Gruppe umfasst Pilzarten, die stark mit Gräserwiesen assoziiert sind. Unter den am häufigsten vertretenen OTUs (Tabelle 3), finden wir eine wichtige Kohorte an Pilzen die zur Ordnung der Agaricales gehören, zu denen viele Mykorrhizasymbionten zählen, wie zum Beispiel die Familie der Hygrophoraceae (*Cuphophyllus*, *Gliophorus*, *Hygrocybe*), Clavariaceae (*Clavaria*), Cortinariaceae und andere. In diesen Pool gehören auch Pilze der primären Endomycorrhizabildner, der Glomeromyceten, mit Arten der Gattung *Acaulospora* sp., oder vielfach Wurzel-assoziierten Ordnung Helotiales (z.B. *Melinomyces bicolor*).

Ein zweiter Pool an Pilzen wird von Mikropilzen gebildet, die ganz typisch für Bodengemeinschaften sind. Dazu zählen die Klassen Leotiomycetes, Morterellomycetes oder Eurotiomycetes (Tabelle 3). Schließlich wird noch ein weiterer wichtiger Pool an Pilzen von bodenbewohnten Hefen gebildet, wie etwa *Salicocozyma terricola* aus der Klasse der Tremellomyceten. Ein recht überraschendes Element im Datensatz ist die Anwesenheit von flechtenbildenden Pilzen in den Bodenschichten. Sie sind wohl nicht direkt ein Bestandteil der Bodengemeinschaft per se, aber ihre Fähigkeit in suboptimalen Habitaten auch ohne Algen zu wachsen, und alternative trophische Strategien wahrzunehmen ist noch nicht gut untersucht und könnte durchaus unterschätzt sein. Es könnte allerdings auch möglich sein, dass Arten der Lecanoromyceten mit besonders reicher Bildung von Sporen wie die Gattung *Acarospora*, die zu den am häufigsten gefunden Pilzen gehören und die in benachbarten Felshabitaten als Flechten auftreten, einen bedeutenden Beitrag deswegen liefern, weil die Sporen in die Gradienten eingetragen wurden und dort als Ablagerungen überdauern.

d. Struktur der Pilzgemeinschaften

Die Strukturen der Pilzgemeinschaften (Beta-diversität) wurden mit Hilfe von Ordinationen visualisiert, insbesondere mit nicht-metrischer Skalierung (NMDS) die wir mit drei Achsen dargestellt haben, nachdem wir sie mit Hilfe ihrer Bray-Curtis Distanzen aus normalisierten Datenmatrizen analysiert haben. Im Gegensatz zu anderen Ordinationsmethoden, bei denen die Verhältnisse der Varianzen an Ordinationsachsen optimiert werden, nutzt NMDS einen iterativen Ordinationsalgorithmus. Ein sogenannter Stressfaktor wird dabei sukzessive minimiert, und damit kann die Information über die Variation erhalten werden. Nach der Optimierung hat die Lösung der NMDS einen Stress-Wert von 0.167, was etwa einer ca. 20% igen Varianz entspricht, bei einer parallel durchgeführten MDS Ordination, die wir als Referenz durchgeführt haben.

Die Ordnungsergebnisse spiegeln wider, dass alle Proben wahrscheinlich derselben globalen Gemeinschaft angehören und einen einzigen gemeinsamen Artenpool entstammen. Dies spiegelt sich in dem geringen Anteil der Variabilität der OTU-Zusammensetzung wider, der durch die Ordination erklärt wird, und die klar hufeisenförmige Projektion auf den Hauptachsen der Ordination. Es gibt jedoch methodische Einschränkungen, die in metagenomischen Datensätzen schwer zu vermeiden sind, wie etwa Prävalenz von Nullwerten (fehlende OTUs) in der Datenmatrix.

Die Einbeziehung taxonomischer Informationen in die Ordnungsprojektionen (Abbildung 16 und Abbildung 17) spiegelt den Beitrag der oben genannten Artenpools wider, insbesondere hinsichtlich des Vorhandenseins von OTUs von Glomeromycota, Glomeromycetes und Rozzellomycetes, die einen positiven Beitrag zur ersten Ordnungsachse leisten.

Die beiden Hauptachsen unterscheiden die drei Probenahmestellen deutlich voneinander (Abbildung 18, Abbildung 19), obwohl es zwischen ihnen eine signifikante Überlappung in den zweidimensionalen Darstellungen gibt. Die Unterschiede zwischen den Positionen im untersuchten ökologischen Gradienten (Abbildung 20) entlang der abgeleiteten Achsen sind mit Ausnahme der Positionen im Gebiet IG weniger deutlich. Wir fanden an dieser Lokalität allerdings auch die Gradienten am ausgeprägtesten, mit einer sehr deutlichen Entwicklung von Schneetälchen.

Tabelle 3. Taxonomische Zusammensetzung des Pilzdatensatzes auf Artniveau. Taxonomische Profile der 40 am häufigsten sequenzierten OTUs.

OTU	Abteilung	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art	reads
3	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	<i>Cuphophyllus</i>	<i>Cuphophyllus aurantius</i>	1433901
4	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	<i>Gliophorus</i>	<i>Gliophorus_laetus</i>	538572
22	Asco.	–	–	–	–	–	381922
12	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	292109
10	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Clavariaceae	<i>Camarophyllopsis</i>	–	289401
23	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	<i>Hygrocybe</i>	<i>Hygrocybe_cantharellus</i>	266245
5	Basidio.	–	–	–	–	–	246423
44	Asco.	Leotiomycetes	–	–	–	–	173050
172	–	–	–	–	–	–	173030
14	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	<i>Hygrocybe</i>	<i>Hygrocybe_miniata</i>	171008
20	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	152685
35	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	Leotiaceae	<i>Neobulgaria</i>	–	150882
6	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	<i>Cuphophyllus</i>	<i>Cuphophyllus_lacmus</i>	140334
588	Mort.	Mortierellomycetes	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	–	131365
25	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	127640
129	–	–	–	–	–	–	114987
28	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	108815
143	Basidio.	Tremellomycetes	Filobasidiales	Piskurozymaceae	<i>Solicoccozyma</i>	<i>Solicoccozyma_terricola</i>	99367
18	Asco.	Lecanoromycetes	Acarosporales	–	–	–	98999
198	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	Vibrisseaceae	<i>Phialocephala</i>	<i>Phialocephala_fortinii</i>	96943
16	–	–	–	–	–	–	90310
38	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	88573
77	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Clavariaceae	<i>Clavaria</i>	–	88096
202	Basidio.	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	<i>Filobasidiella</i>	–	88041
26	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	84761
103	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Clavariaceae	<i>Clavaria</i>	<i>Clavaria_flavipes</i>	80884
31	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	Helotiaceae	<i>Meliniomyces</i>	<i>Meliniomyces_bicolor</i>	79717
61	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	Incertae sedis	<i>Leohumicola</i>	–	78092
250	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	Hyaloscyphaceae	<i>Hyaloscypha</i>	–	75763
124	Asco.	Eurotiomycetes	Chaetothyriales	–	–	–	75598
33	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	–	–	–	73886
109	Asco.	Leotiomycetes	–	–	–	–	73377
169	Asco.	Leotiomycetes	Thelebolales	Pseudeurotiaceae	<i>Pseudeurotium</i>	<i>Pseudeurotium_bakeri</i>	71291
1319	Glom.	Glomeromycetes	Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	<i>Acaulospora_brasiliensis</i>	71087
27	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Cortinariaceae	<i>Cortinarius</i>	<i>Cortinarius_diasemospermus</i>	70740
63	Asco.	–	–	–	–	–	70682
175	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Strophariaceae	<i>Galerina</i>	<i>Galerina_allospora</i>	67732
108	Basidio.	Agaricomycetes	Agaricales	Hydnangiaceae	<i>Laccaria</i>	–	67105
409	Asco.	Sordariomycetes	Hypocreales	Cordycipitaceae	<i>Beauveria</i>	–	66820
17	Asco.	Leotiomycetes	Helotiales	Helotiaceae	<i>Meliniomyces</i>	<i>Meliniomyces_bicolor</i>	65770

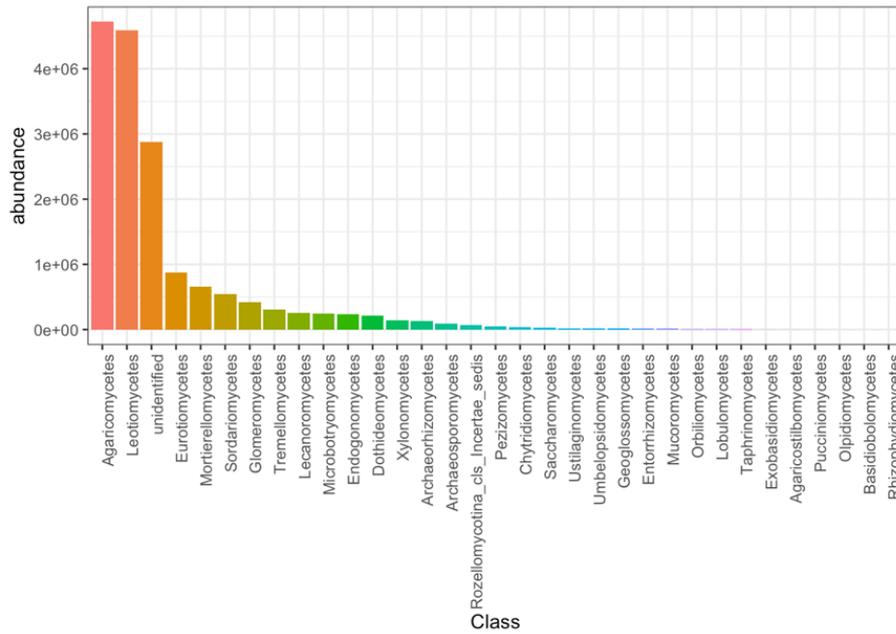


Abbildung 9. Taxonomische Zusammen-setzung des Pilzdatensatzes auf dem Niveau von Klassen. Die Säulen stellen die kumulative Häufigkeit der Sequenzablesungen dar. Sequenzen die nicht zugeordnet werden konnten wurden weggelassen.

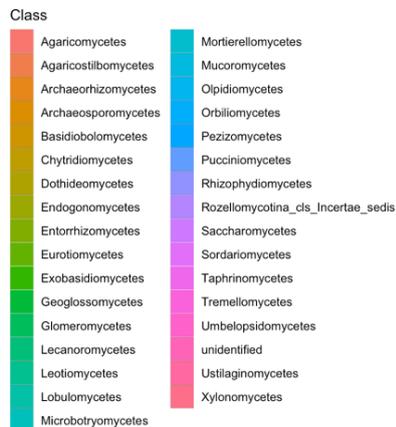
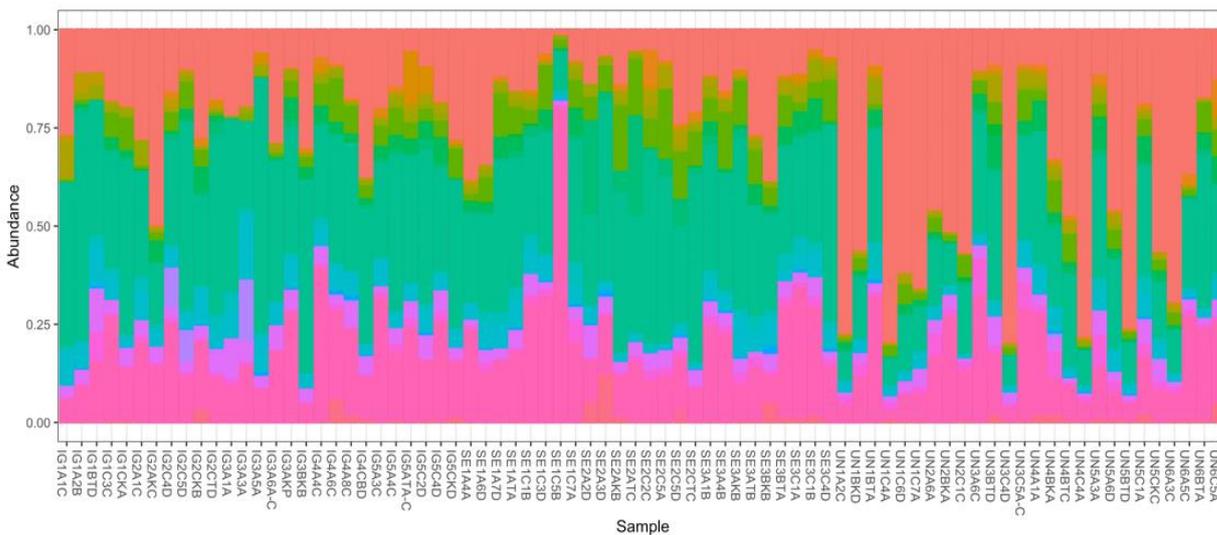


Abbildung 10. Taxonomische Zusammensetzung der Pilze in den einzelnen Samples auf dem Niveau von Klassen. Die Säulen zeigen die Anteile der Samples an den Pilzklassen. OTUs für Pilze, die keiner Pilzklasse zugeordnet sind, wurden weggelassen.

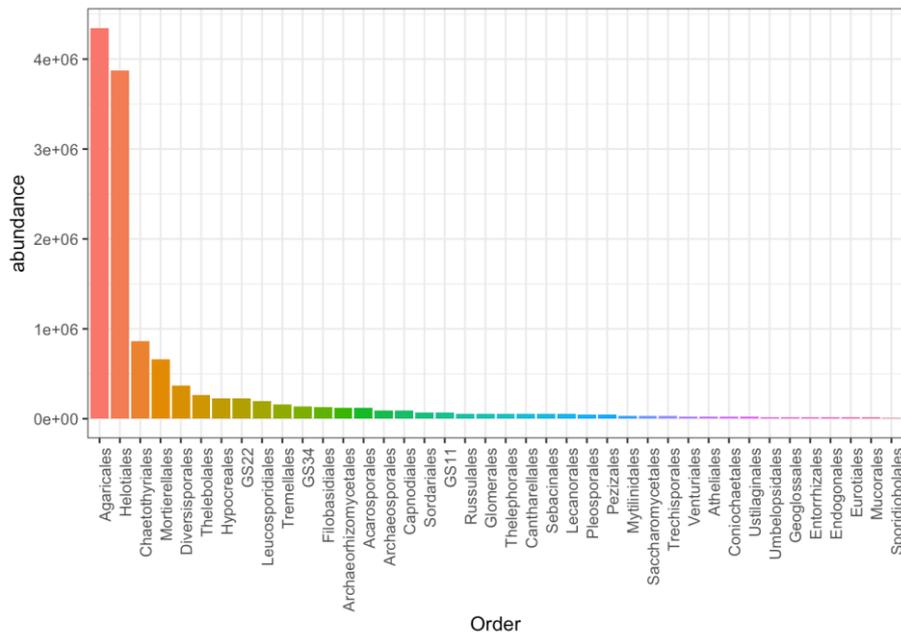


Abbildung 11. Taxonomische Zusammensetzung des Pilzdatensatzes auf dem Niveau von Ordnungen. Hier werden nur die 40 häufigsten Taxa gezeigt. Die Säulen zeigt die kumulative Häufigkeit der Sequenzablesungen. Weil die Anzahl von – reads gegen niedrigere taxonomische Niveaus linear zunimmt, werden – reads von der Darstellung zugunsten der Klarheit ausgenommen.

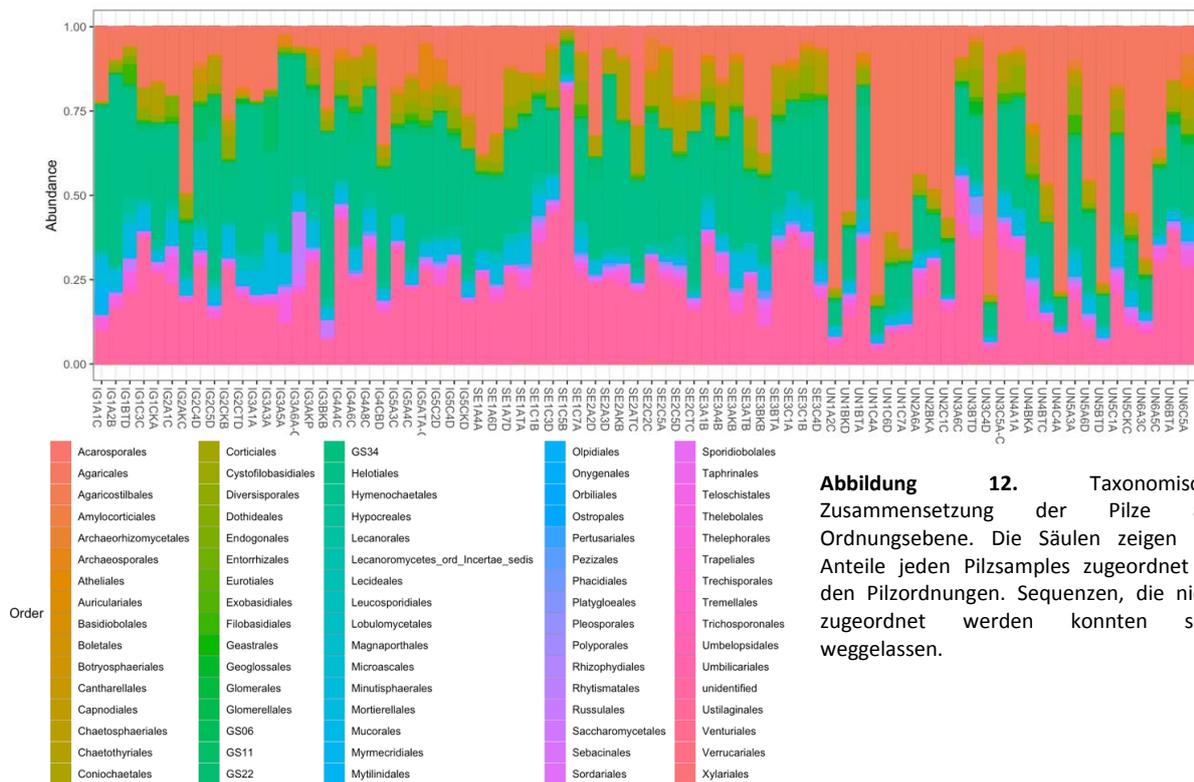


Abbildung 12. Taxonomische Zusammensetzung der Pilze auf Ordnungsebene. Die Säulen zeigen die Anteile jeden Pilzsamples zugeordnet zu den Pilzordnungen. Sequenzen, die nicht zugeordnet werden konnten sind weggelassen.

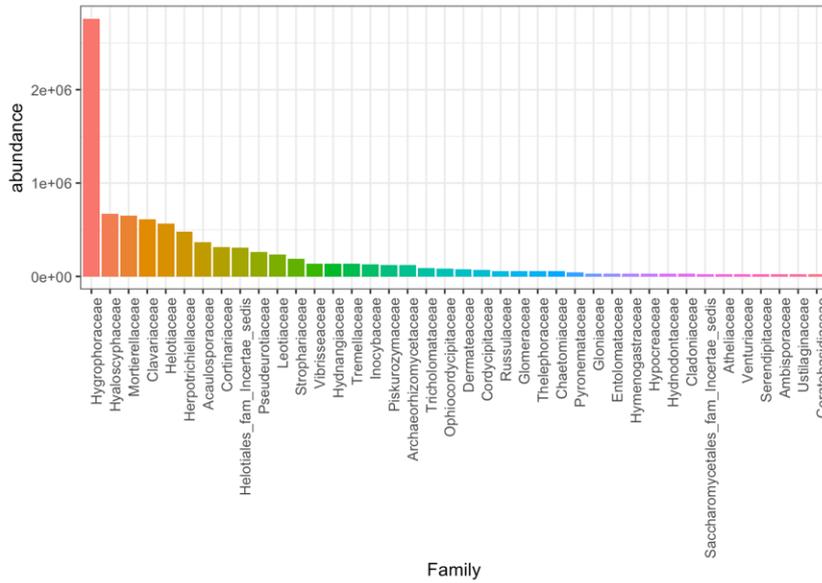


Abbildung 13. Taxonomische Zuordnung des Pilzdatensatzes auf Familienebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.

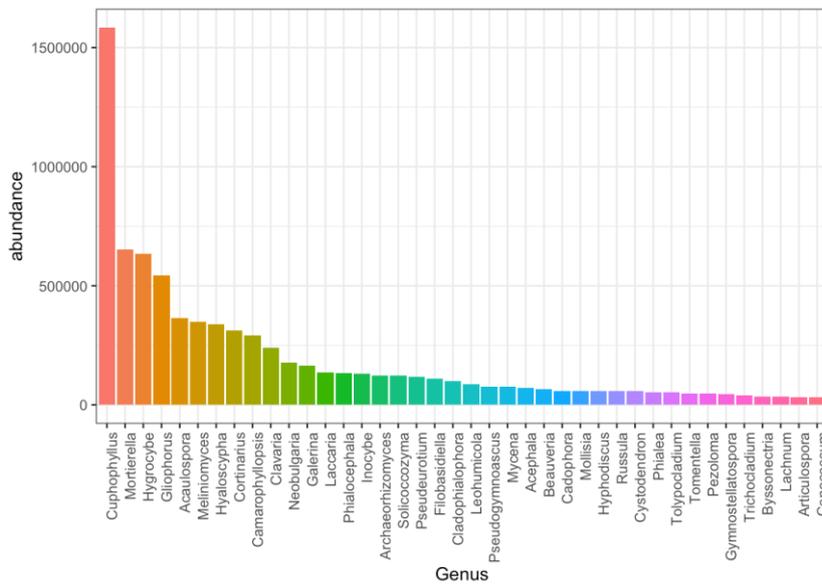


Abbildung 14. Taxonomische Zuordnung des Pilzdatensatzes auf Gattungsebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.

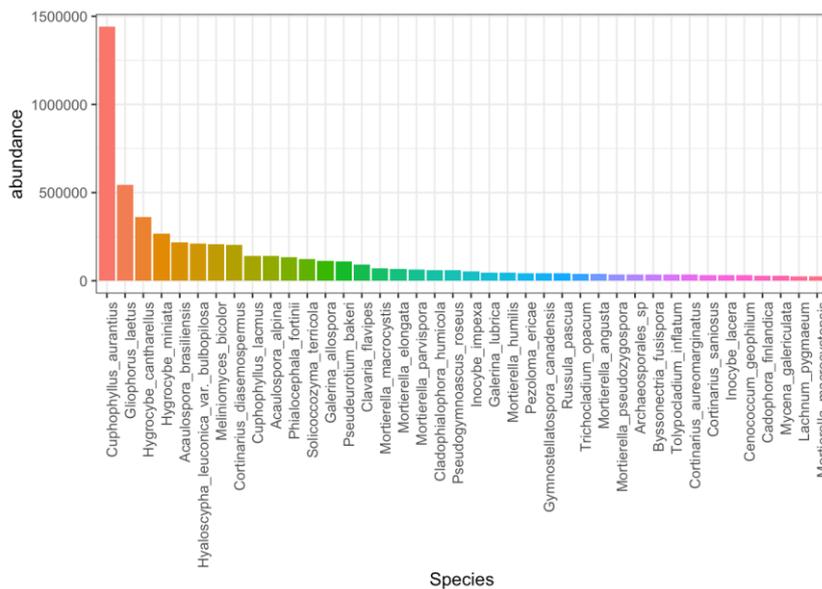


Abbildung 15. Taxonomische Zuordnung des Pilzdatensatzes auf Artenebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.

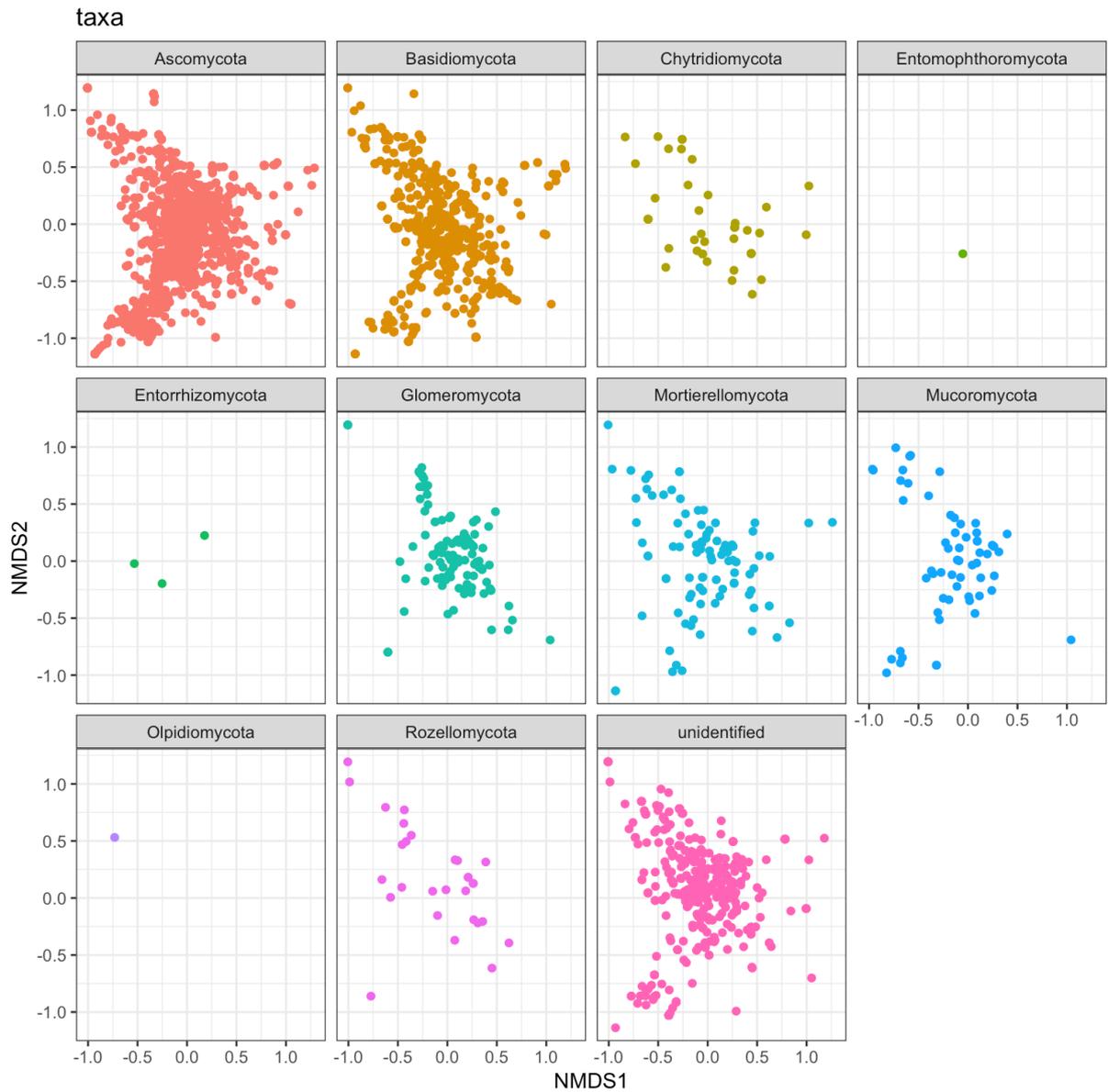


Abbildung 16. Graphische Darstellung der NMDS Ordination des Pilzdatensatzes (ITS). Die Resultate der beiden ersten Ordinationsachsen werden gezeigt. Die Punkte im Plot geben den Beitrag der verschiedenen OTUs zu jeder Achsenstreckung wieder, Farben entsprechen taxonomischen Divisionen.

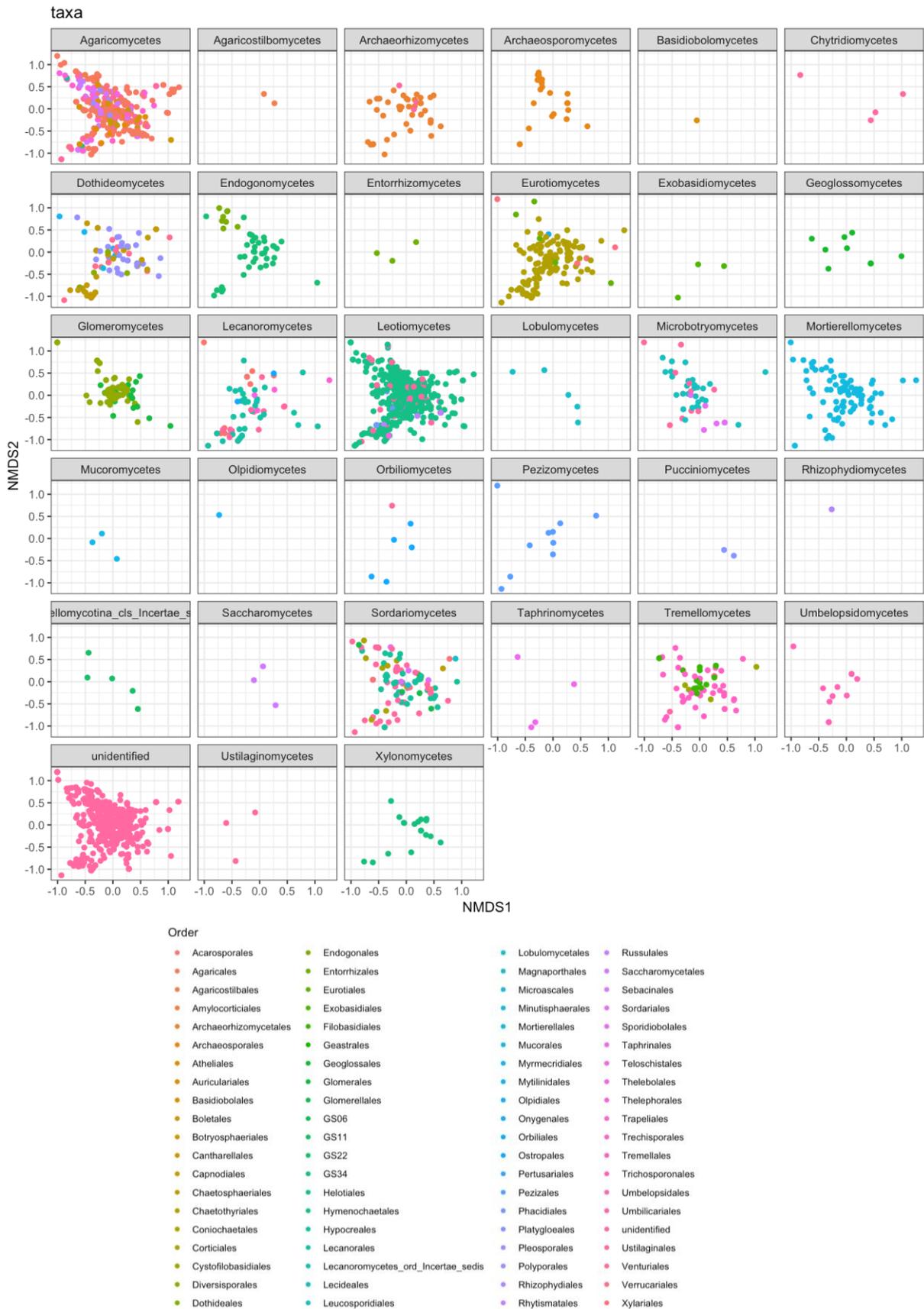


Abbildung 17. Pilzdatensatz. Graphische Darstellung der NMDS Ordination mit zwei Ordinationsachsen. Punkte im Plot repräsentieren die Beiträge der verschiedenen OTUs zu jeder Achse. Facetten und Farben repräsentieren die taxonomische Zuordnung auf Klassenebene.

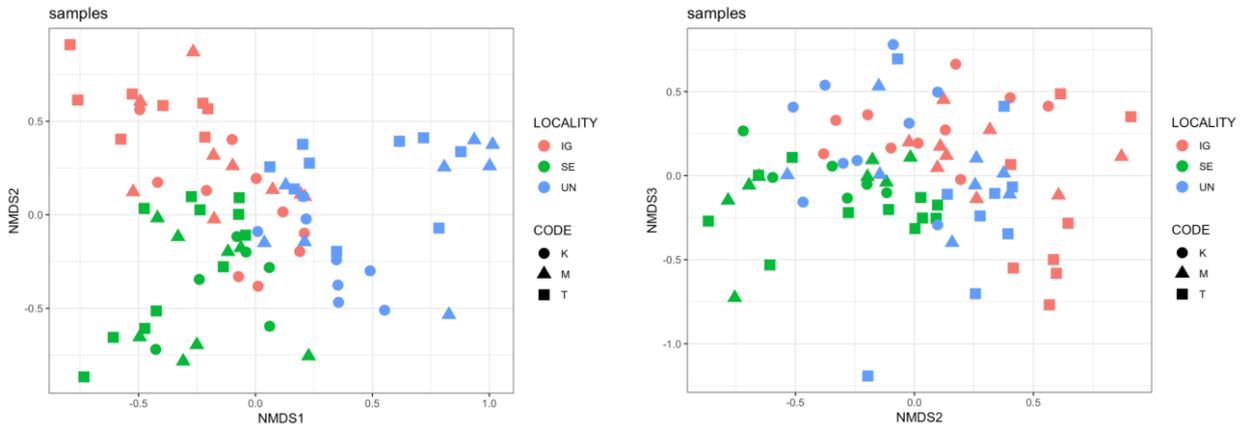


Abbildung 18. Pilzdatensatz. Detaillierte graphische Darstellung der NMDS Ordination mit drei Ordinationsachsen. Der linke Plot zeigt Achsen eins und zwei, während der rechte Plot die Achsen zwei und drei wiedergibt. Punkte im Plot stellen die Platzierung der Samples in der zweidimensionalen Projektion dar. Farben repräsentieren die Sampling-Lokalität und Formen die Position im Gradienten (K,M,T).

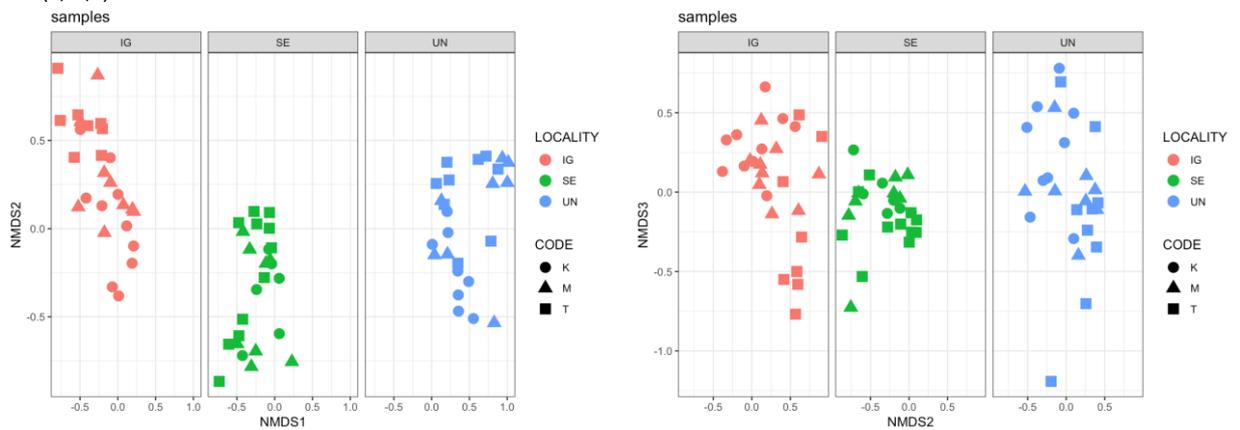


Abbildung 19. Pilzdatensatz. Detaillierte graphische Darstellung der NMDS Ordination mit drei Ordinationsachsen und unter Trennung der Samples nach Sampling-Lokalität. Der linke Plot zeigt Achsen eins und zwei, während der rechte Plot die Achsen zwei und drei wiedergibt. Punkte im Plot stellen die Platzierung der Samples in der zweidimensionalen Projektion dar. Farben repräsentieren die Sampling-Lokalität und Formen die Position im Gradienten (K,M,T).

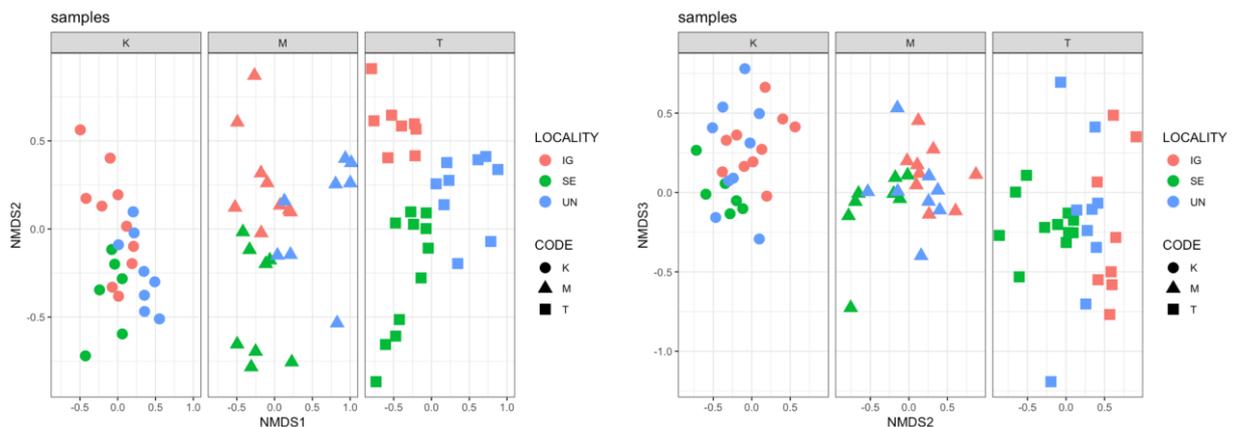


Abbildung 20. Pilzdatensatz. Detaillierte graphische Darstellung der NMDS Ordination mit drei Ordinationsachsen und unter Trennung der Samples nach den Positionen im Gradienten. Der linke Plot zeigt Achsen eins und zwei, während der rechte Plot die Achsen zwei und drei wiedergibt. Punkte im Plot stellen die Platzierung der Samples in der zweidimensionalen Projektion dar. Farben repräsentieren die Sampling-Lokalität und Formen die Position im Gradienten (K,M,T).

e. OTU Reichhaltigkeit und Diversität im Pilzdatensatz.

Die Diversität der OTUs wurde sample-weise über den Gradienten studiert, wobei 3 Reichhaltigkeitsmaße ermittelt wurden: Beobrierte OTU Reichhaltigkeit basierend auf Rohdaten, Chao's rarefizierter Reichhaltigkeits-Estimator und ACE rarefizierte Reichhaltigkeit. Für die Ermittlung der Diversität zogen wir die aus der Informationstheorie stammenden Indices Shannon, Simpson und Inverse Simpson heran.

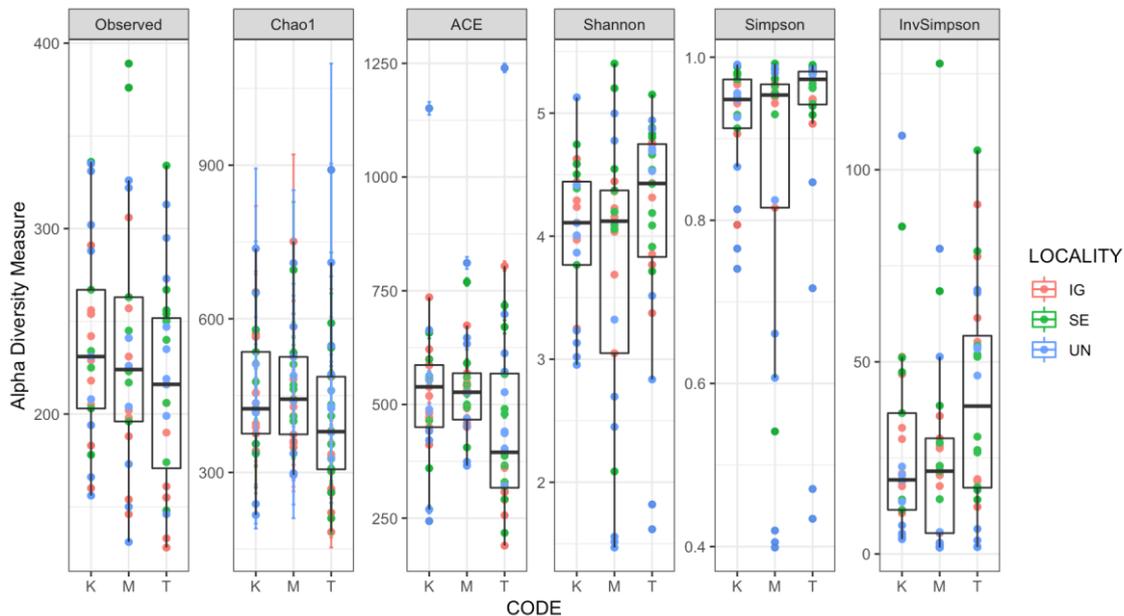


Abbildung 21. Graphische Repräsentation der Muster von OTU richness und Diversität im Pilzdatensatz für die drei Positionen des topologischen Gradienten (K,M,T). Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquartilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.

Über die Lokalitäten übergreifend scheint es eine klare Reduktion der richness in Richtung der Gradienten-pessima zu geben (Schneetälchen) (Abbildung 21), ein Trend, der jedoch nicht begleitet wird von einer Abnahme der Diversität. Wenn wir jedoch die Werte für die Lokalitäten getrennt betrachten, wird klar, dass die richness Abnahme nur in Lokalität IN deutlich ist (Abbildung 22). Siehe dazu auch die Ordinationsplots für die einzelnen Lokalitäten (Abbildung 19). Diese Beobachtung lässt sich für die anderen Lokalitäten nicht machen, hier gibt es keine klaren Trends in richness oder Diversität (Abbildung 22).

f. Modellierung der Pilzdiversität

Zunächst wird die Null-Erwartung einer Normalverteilung anhand der stichprobenweisen Reichhaltigkeits- und Diversitätsindizes getestet. Während Chao's rarefizierender Estimator der Reichhaltigkeit von der Normalität abweicht, sprechen alle anderen Indizes mit einer Normalverteilung überein. Die beobachtete Reichhaltigkeit ist marginal nicht signifikant (Tabelle 4).

Wir erhielten nicht übereinstimmende Hinweise auf Homoskedastizität (Homogenität der Varianz) bei einer Einwegs Rang-ANOVA (Tabelle 5) beim Kruskal-Wallis Rangsummentest und bei Bartlett's Test (Tabelle 6). Der Kruskal-Wallis gibt an dass nur ACE Werte ungleich Varianzen zwischen den Gruppen (Positionen im Gradienten) haben, während Bartlett's Test sowohl für ACE und Shannon Indizes eine signifikante Heteroskedastizität angaben.

Mit dem Wilcoxon's Rangsummentest (Tabelle 7) testeten wir nun die paarweisen Unterschiede der mittleren Werte von den unterschiedlichen Positionen im ökologischen Gradienten. Insgesamt zeigen die Holm-adjustierten Wahrscheinlichkeitswerte, dass die Reichhaltigkeits- und Diversitätsindizes einer gleichen Verteilung angehören (Tabelle 7). Das bedeutet nun schlicht gesagt, dass es bei unserer Aufnahme keine signifikanten Gemeinschaftsstrukturen entlang der Gradienten gibt. Dieses Ergebnis wird auch weiter dadurch untermauert weil auch die linear gemischten Modelle, die die Samplingdichte (anzahl der abgelesenen Sequenzen) als Kovariate und die Lokalität als Zufallsfaktor berücksichtigte. Nach diesen Resultaten ist es erwähnenswert, dass ACE Reichhaltigkeit und der inverse Simpson Diversitätsindex sehr robust gegenüber der Samplingdichte ist, ganz anders als der Chao Index.

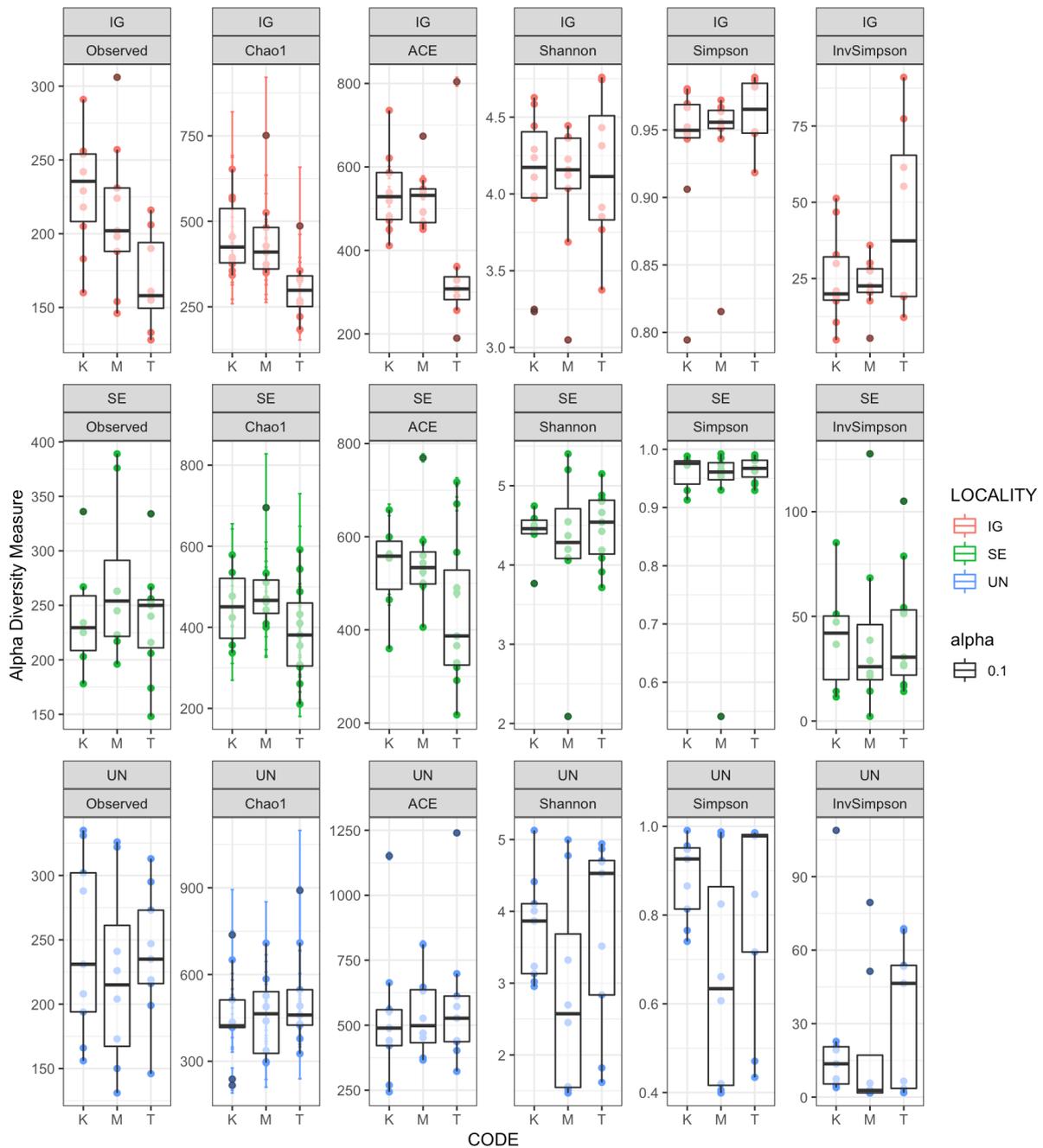


Abbildung 22. Graphische Repräsentation der Muster von OTU richness und Diversität im Pilzdatensatz für die drei Positionen des topologischen Gradienten (K,M,T), separiert für die Lokalitäten. Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquantilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.



Tabelle 4. Test auf Normalverteilung der Diversitätswerte im Pilzdatensatz. Shapiro-Wilk Normalverteilungstest.

	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
statistic	0.9713	0.9642	0.9079	0.8891	0.6156	0.8774
p.value	0.0756	0.0273	3.3375	5.5499	5.5900	1.9675

Tabelle 5. Heteroskedastizität der Diversitätsmaße für den Pilzdatensatz. Kruskal-Wallis Rangsummentest.

	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
parameter	2	2	2	2	2	2
statistic	1.5411	3.8618	6.4690	2.7585	3.8881	3.8881
p.value	0.4627	0.1450	0.0393	0.2517	0.1431	0.1431

Tabelle 6. Heteroskedastizität der Diversitätsmaße für den Pilzdatensatz. Bartlett's Test auf Homogenität der Varianzen.

	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
parameter	2	2	2	2	2	2
statistic	1.7430	1.9088	11.495	9.5858	22.346	0.4756
p.value	0.4183	0.3850	0.0031	0.0082	1.4044	0.7883

Tabelle 7. Unterschiede in der statistischen Verteilung der Reichhaltigkeit und Diversität im Pilzdatensatz zwischen Positionen des Gradienten. Wilcoxon Rangsummentest. Tabellenwerte repräsentieren die adjustierte Holm-Wahrscheinlichkeit, dass Diversitäts- und Reichhaltigkeitsmaße für die K,M,T Positionen der gleichen Grundgesamtheit angehören.

	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
KM	1	0.7636	0.9234	0.5507	0.7583	0.7583
KT	0.6268	0.2597	0.1146	0.4735	0.2668	0.2668
MT	1	0.2195	0.0446	0.4735	0.2668	0.2668



Die Modellierung der Reichhaltigkeit und Diversität der pilzlichen OTUs als Funktion der Position im Gradienten, Lokalität als Zufallsfaktor und Samplingdichte als Kovariate lieferte keine klaren Ergebnisse (Tabelle 8–10). Interessanterweise hat die Samplingdichte dabei einen deutlicheren Einfluss auf die Resultate im Gegensatz zu ACE.

Tabelle 8. Einfluss der Position im Gradienten auf OTU-Reichtum und -Diversität im Pilzdatensatz. Linear gemischte Modelle, die Lokalitäten als Blöcke heranziehen und Samplingintensität als Kovariate.

		<i>Dependent variable:</i>				
		Observed values				
	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
Slope	-7.026 (7.315)	-17.424 (18.295)	-33.725 (24.077)	-0.032 (0.114)	-0.020 (0.017)	5.138 (3.798)
Intensity	94.295*** (26.359)	122.208** (61.951)	75.702 (81.530)	-1.188*** (0.417)	-0.308*** (0.063)	-19.991 (13.016)
Constant	199.172*** (22.993)	417.848*** (53.369)	542.178*** (70.236)	4.606*** (0.374)	1.084*** (0.056)	31.279*** (11.200)
Observations	78	78	78	78	78	78
Log Likelihood	-419.977	-490.972	-512.393	-95.569	52.369	-368.387
Akaike Inf. Crit.	849.953	991.943	1,034.787	201.138	-94.738	746.774
Bayesian Inf. Crit.	861.737	1,003.727	1,046.570	212.921	-82.954	758.557

Note: * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$

Tabelle 9. Einfluss der Position im Gradienten auf OTU-Reichtum und -Diversität im Pilzdatensatz. Zusammenfassung der Nullmodelle, die Lokalitäten als Blöcke heranziehen und Samplingintensität als Kovariate

		<i>Dependent variable:</i>				
		Observed values				
	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
Intensity	99.105*** (25.882)	132.393** (61.374)	95.415 (81.310)	-1.166*** (0.409)	-0.294*** (0.062)	-23.092* (13.137)
Constant	182.531*** (14.848)	377.510*** (32.657)	464.102*** (43.265)	4.531*** (0.257)	1.035*** (0.039)	43.249*** (7.187)
Observations	78	78	78	78	78	78
Log Likelihood	-420.424	-491.423	-513.362	-95.608	51.667	-369.268
Akaike Inf. Crit.	848.849	990.845	1,034.724	199.216	-95.334	746.536
Bayesian Inf. Crit.	858.276	1,000.272	1,044.151	208.643	-85.907	755.963

Note: * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$



Tabelle 10. Unterstützung für den Einfluss der Position im Gradienten auf die Diversitätswerte der Pilze. Zusammenfassung der ANIVA Vergleiche zwischen Nullmodell und vollständigem Modell.

	Df	AIC	BIC	logLik	deviance	Chisq	Chi Df	Pr(> Chisq)
Observed.null	4	848.849	858.276	-420.424	840.849			
Observed	5	849.953	861.737	-419.977	839.953	0.896	1	0.344
Chao1.null	4	990.845	1,000.272	-491.423	982.845			
Chao1	5	991.943	1,003.727	-490.972	981.943	0.902	1	0.342
ACE.null	4	1,034.724	1,044.151	-513.362	1,026.724			
ACE	5	1,034.787	1,046.570	-512.393	1,024.787	1.938	1	0.164
Shannon.null	4	199.216	208.643	-95.608	191.216			
Shannon	5	201.138	212.921	-95.569	191.138	0.078	1	0.780
Simpson.null	4	-95.334	-85.907	51.667	-103.334			
Simpson	5	-94.738	-82.954	52.369	-104.738	1.404	1	0.236
InvSimpson.null	4	746.536	755.963	-369.268	738.536			
InvSimpson	5	746.774	758.557	-368.387	736.774	1.762	1	0.184

g. Assoziationen im Pilzdatensatz

Die Assoziationen zwischen OTUs bzw. taxonomischen Gruppen von OTUs der Transekte wurde mit einer Methodologie getestet, die an und für sich im Rahmen der Untersuchung von differenzieller Genexpression entwickelt und in das Paket edgeR implementiert wurde. Dieser Ansatz ermöglicht das Durchführen und Testen komplexer Vergleiche zwischen mehreren Orten und das Einbeziehen der Position im Gradienten als lineare Variable in ein lineares Modellgerüst. Für diese Projekt haben wir aber die Resultate von paarweiser exakter Tests herangezogen um die taxonomische Zusammensetzung von oberen und unteren Anteilen (K vs T) der Gradienten zu studieren; komplexere Modelle stellen einen Aufwand dar, der weit über ein Pilotprojekt hinausgehen würde.

In der ersten Analyse haben wir das unterschiedliche Vorhandensein von Amplikons auf OTU-Ebene zwischen der oberen (K) und unteren Fraktion (T) des Transektes getestet. Wir haben dabei nur OTUs mit einer kumulativen Varianz über einem Schwellenwert von 10^5 berücksichtigt, und testeten wievielfach sie sich zwischen den ökologischen Fraktionen unterschieden. Der ermittelte Wert der allgemeinen Dispersion betrug 4.81. Daneben testeten wir die differentielle Präsenz von Amplicons wie sie sich als Gattungen, Ordnungen, und Klassen aggregieren (Abbildungen 23-25).

Eine umfassende Tendenz ist nicht stark ausgeprägt, weil die Pilzgemeinschaft weitgehend homogen ist. Es zeigt sich jedoch eine stärkere Präsenz von Ectomyorrhiza-Pilzen wie die Gattungen *Clavulina* oder *Hygrocybe* und große saprotrophe Basidiomycota wie *Ramariopsis*, *Conocybe* oder *Entoloma* gegen die untere Fraktion der Gradienten. Die obere Fraktion zeigt eine höhere Dominanz von Mikropilzen die mit oligotrophen Böden in Verbindung gebracht werden kann sowie Endo- und ektotrophe Mykorrhizapilze. Es ist hier besonders bemerkenswert wie Flechten-“kontamination” mit der oberen Fraktion der Gradienten assoziiert ist.

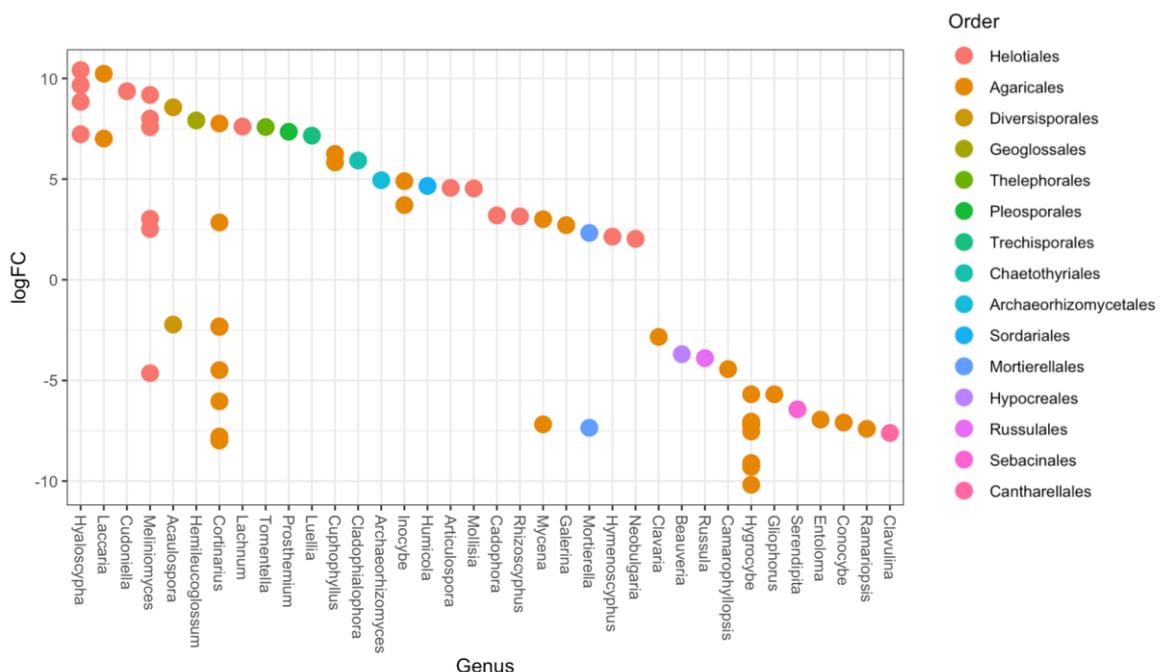


Abbildung 23. Pilzlicher ITS-Datensatz. Abweichungen als Vielfaches der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion der Umweltgradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind dabei durch ihre Zuordnung zu Gattungen zusammengefasst. Nur solche



Gattungen mit Varianz größer 10^5 werden einbezogen, bzw. solche mit signifikanter Abweichung ($p > 0.01$). Farbkodes entsprechen den Zuordnungen zu Pilzordnungen.

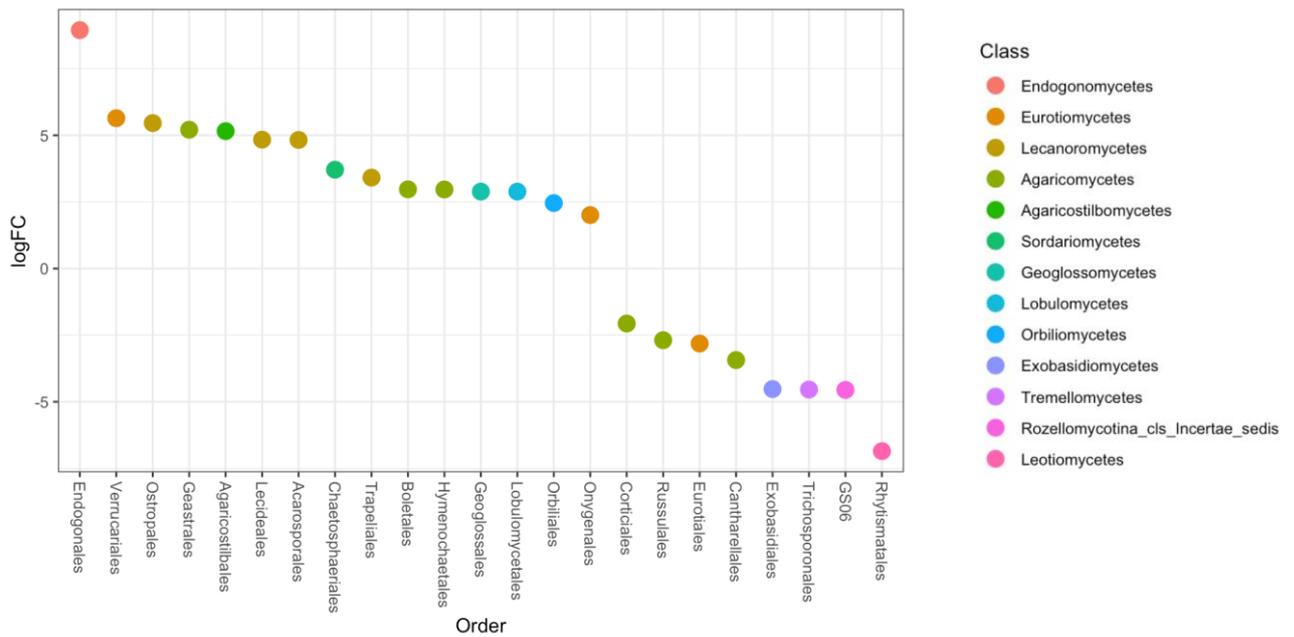


Abbildung 24. Pilzlicher ITS-Datensatz. Abweichungen als Vielfaches der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion der Umweltgradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind dabei durch ihre Zuordnung zu Gattungen zusammengefasst. Nur solche Ordnungen mit Varianz größer 10^4 werden einbezogen, bzw. solche mit signifikanter Abweichung ($p > 0.05$). Farbkodes entsprechen den Zuordnungen zu Pilzklassen.

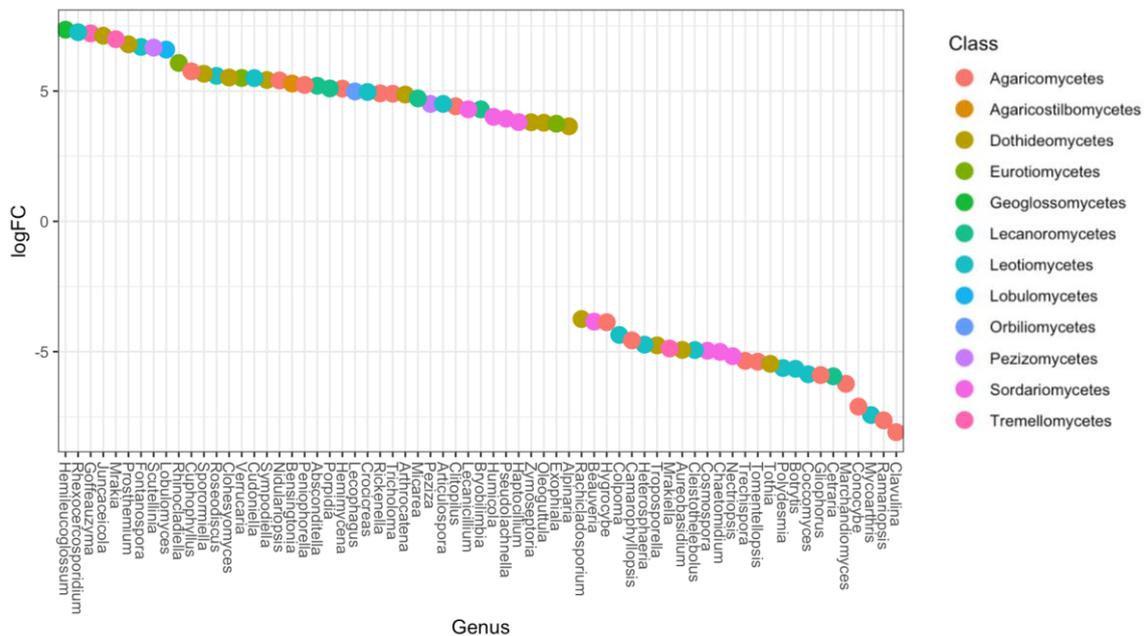


Abbildung 25. Pilzlicher ITS-Datensatz. Abweichungen als Vielfaches der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion der Umweltgradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind dabei durch ihre Zuordnung zu Gattungen zusammengefasst. Nur solche Gattungen mit Varianz größer 10^4 werden einbezogen, bzw. solche mit signifikanter Abweichung ($p > 0.01$). Farbkodes entsprechen den Zuordnungen zu Pilzklassen.

h. Taxonomische Zusammensetzung des Prokaryotendatensatzes

Die wichtigsten taxonomischen Muster im bakteriellen Datensatz, die sich aus der Sequenzierung eines Genabschnittes der 16S rRNA ergeben, sind in den Abbildungen 26–34 und in Tabelle 11 zusammengefasst. Taxonomische Daten, die durch den Vergleich von DNA-Sequenzen mit Referenzdatenbanken abgerufen werden, bieten eine wichtige Möglichkeit die Sequenzen vergleichend zu analysieren. Ein großer Teil der sequenzierten Ausgangsdaten sind zumindest bis zur Ebene der Bakterienstämme zuordenbar, oft auch bis zur Ebene von Klassen. Jedoch bleibt immer auch ein bestimmter Anteil der Diversität nicht vollständig klassifizierbar, weil die Referenzdatenbanken nicht vollständig sind. Dies betrifft eher die Zuordnung von Sequenzen zu Gattungen oder zu Arten (Abbildungen 26–34). Dieser Umstand kann damit zu tun haben, dass bereits in die Referenzdatenbank eingebundene Sequenzen mangelhaft taxonomisch zugeordnet sind, oder dass wir in unserem Datensatz tatsächlich auch gänzlich neue Bakteriengruppen vorliegen haben. Da alpine Habitats bislang nicht zu den am intensivsten untersuchten mikrobiellen Habitats gehören und angesichts der immensen Diversität an bereits bekannten Bakterien ist mit letzterer Möglichkeit durchaus zu rechnen.

Die am häufigsten vertretenen taxonomischen Gruppen sind jene, die typischerweise mit sauren Böden verbunden sind, und jene, die mit der Rhizosphäre verbunden sind. Das am häufigsten vorkommende Phylum sind die Proteobakterien, von denen Rhizobiales eine wichtige Fraktion ausmachen. *Bradirhizobium* ist eine der am häufigsten durch die OTUs vertretenen Gattungen (Tabelle 11). Die nächsten wichtigen Gruppen sind Acidobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi und Actinobacteria, gefolgt von anderen weit verbreiteten, aber weniger häufig vorkommenden Taxa wie Verrucomicrobia. Das taxonomische Gesamtprofil wird in den Abbildungen 26–34 näher erläutert.

Alle taxonomischen Hauptgruppen auf Stamm- und Klassenebene sind in den Abbildungen 26–34 zu gleichen Teilen vertreten und tragen nicht differentiell zu den Ordinerungsachsen bei, wie in den Abbildungen 32–33 gezeigt. Dies widerspiegelt, dass die meisten Informationen über die Struktur der Bakteriengemeinschaft sich mehr aus den Unterschied zwischen Orten als zwischen Positionen im Gradienten ergeben.

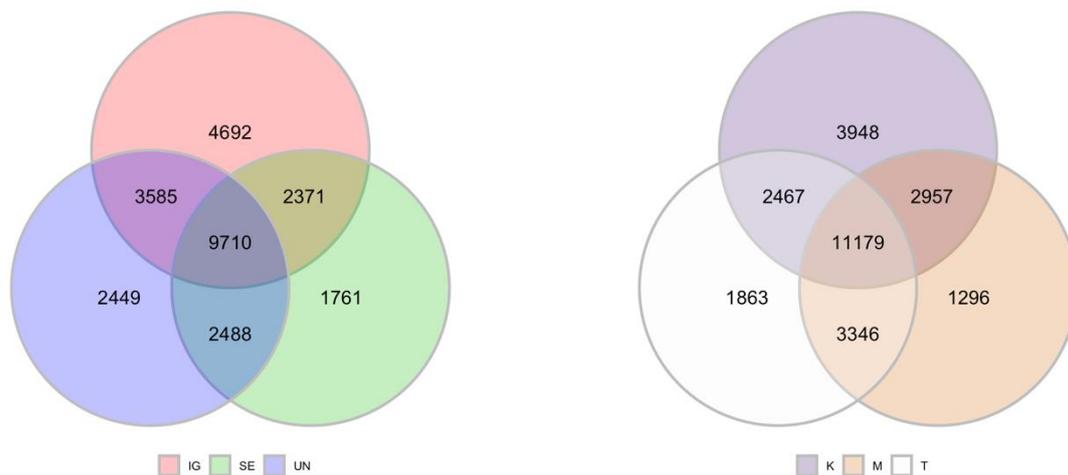


Abbildung 26. Bakteriendatensatz (Basierend auf der Sequenzierung der variablen Regionen V3 und V4 des 16S ribosomalen RNA Gens). Links, die Zahl der gemeinsamen und exklusiven OTUs zwischen Lokalitäten, und rechts, zwischen den Teilen des ökologischen Gradienten.

i. Struktur der Prokaryotengemeinschaften

In der Identifizierung der bakteriellen Gemeinschaftstrukturen erkennt auf den ersten Blick keine klaren Differenzierungsmuster in den Hauptgruppen. Auf taxonomischer Ebene sind deshalb alle wichtigen taxonomischen Gruppen auf Phylum- und Klassenebene in allen Stichproben gleichermaßen vertreten. Unter Verwendung normalisierter OTU Tabellen verschwanden dabei minimale Unterschiede, und die Berücksichtigung der phylogenetischen Verwandtschaft (basierend auf phylogenetischen Bäumen) half, eine gewisse Divergenz zwischen Samples zu vermeiden, die auf lediglich fehlenden OTUs beruhen würde. Daraus resultieren beruhende Gruppierungsergebnisse auf den Unifrac Distanzen zwischen Samples und auf MDS und nicht NMDS (Abbildungen 35-38). Die von den beiden Hauptachsen erfasste Gesamtvariabilität ist relativ gering (ca. 19%). Die Interpolation von taxonomischen Kategorien reflektiert keinen wesentlichen taxonomischen Unterschied zwischen Lokalität oder zwischen Positionen in den Gradienten. Die Gruppierungsachsen der Ordination trennte Lokalitäten aber nicht stark, was auf den starken Einfluss gemeinsam auftretender OTUs zurückzuführen ist. Der wichtige Trend, den man hier in den Gruppierungsergebnissen sehen kann, ist eine leichte Überdispersion in den Samples von den unteren Teilen des Gradienten, im Gegensatz zur den Samples von mittleren und oberen Teilen des Gradienten.



Tabelle 11. Taxonomische Zusammensetzung des Bakteriendatensatzes auf Artniveau, unter Berücksichtigung der 40 am häufigsten sequenzierten OTUs.

OTU	Stamm	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	Art	Sequenzhäufigkeit
8	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Nitrobacter	–	241329
30	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Ktedonobacteraceae	–	–	218125
24	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Thermomonosporaceae	Actinoallomurus	–	193391
17	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	–	–	178057
247	Proteobacteria	Betaproteobacteria	A21b	EB1003	–	–	164686
136	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	C. Koribacter	versatilis	150047
589	Actinobacteria	Thermoleophila	Solirubrobacterales	Conexibacteraceae	Conexibacter	–	135723
18	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	–	–	–	–	133122
295	–	–	–	–	–	–	117412
320	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	–	–	–	–	115217
717	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Gemmataceae	–	–	109315
6	Acidobacteria	DA052	Ellin6513	–	–	–	107037
88	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Thermogemmatissporales	Thermogemmatissporaceae	–	–	106645
5	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Thermogemmatissporales	Thermogemmatissporaceae	–	–	104012
104	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Beijerinckia	–	102539
1	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	C. Koribacter	versatilis	99536
554	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	MVS-65	–	–	97344
302	–	–	–	–	–	–	90549
71	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	–	–	83209
509	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	A17	–	82146
1340	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	PK34	–	–	79221
760	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	PK34	–	–	79129
1286	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	PK34	–	–	74787
1415	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	–	–	–	72629
1131	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	–	–	–	71696
192	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Isosphaeraceae	Nostocoida	limicola	71391
67	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	–	–	70946
94	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Thermogemmatissporales	Thermogemmatissporaceae	–	–	70211
280	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	–	–	–	–	69617
639	–	–	–	–	–	–	69440
237	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	MVS-65	–	–	69190
108	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	longiquaesitum	66815
1475	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	–	–	–	65296
63	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Koribacteraceae	–	–	62434
588	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	MVS-65	–	–	62413
846	Acidobacteria	Solibacteres	Solibacterales	–	–	–	61716
323	AD3	JG37-AG-4	–	–	–	–	60146
221	Verrucomicrobia	[Spartobacteria]	[Chthoniobacterales]	[Chthoniobacteraceae]	DA101	–	59976
1394	Planctomycetes	Planctomycetia	Gemmatales	Isosphaeraceae	–	–	59768
518	Verrucomicrobia	[Spartobacteria]	[Chthoniobacterales]	–	–	–	59400



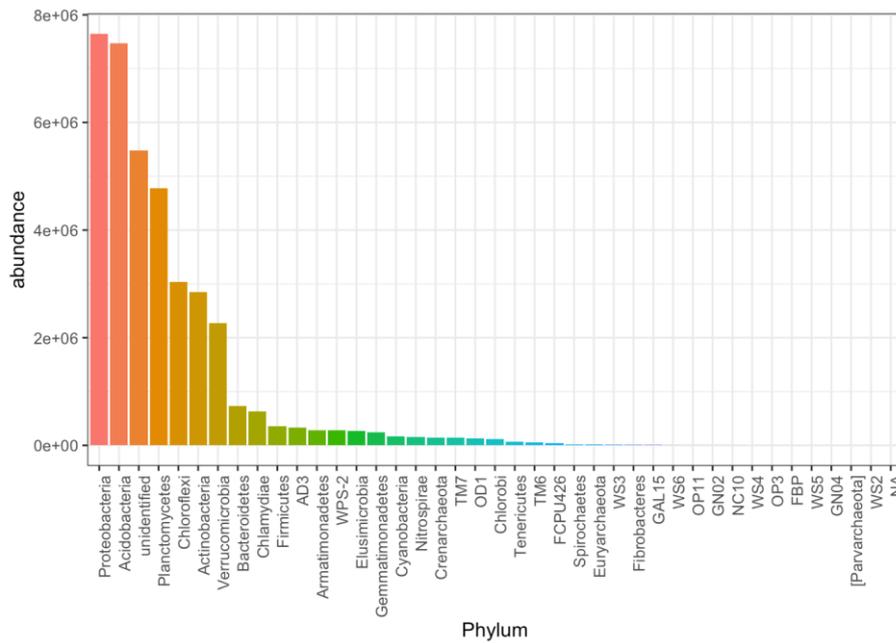


Abbildung 27. Taxonomische Zusammensetzung der Bakterien auf Phylumebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen.

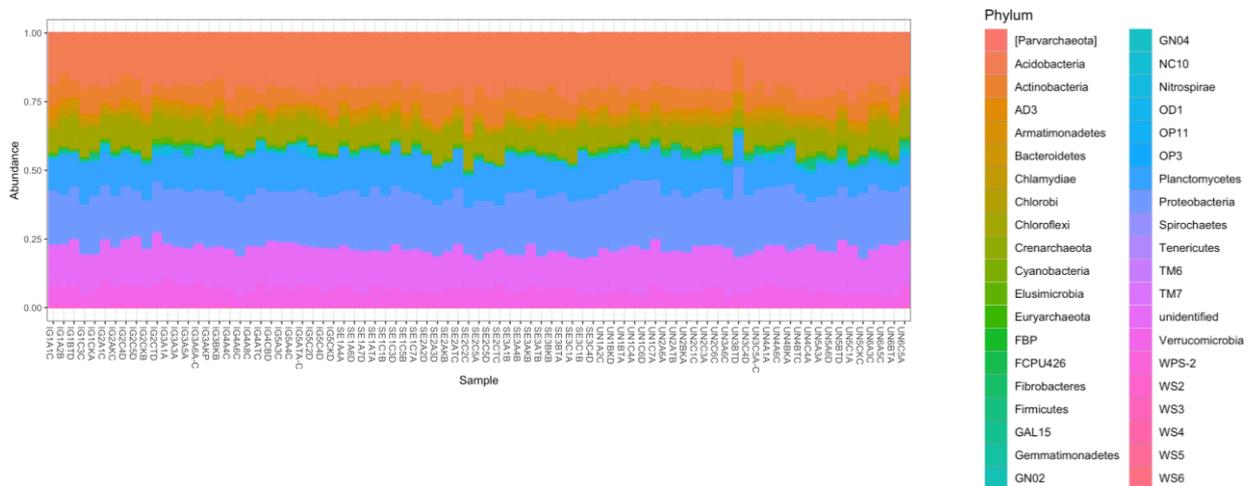


Abbildung 28. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten auf Phylumebene. Die Säulenhöhen zeigen den Anteil eines jeden Samples zu den sequenzierten Phyla.

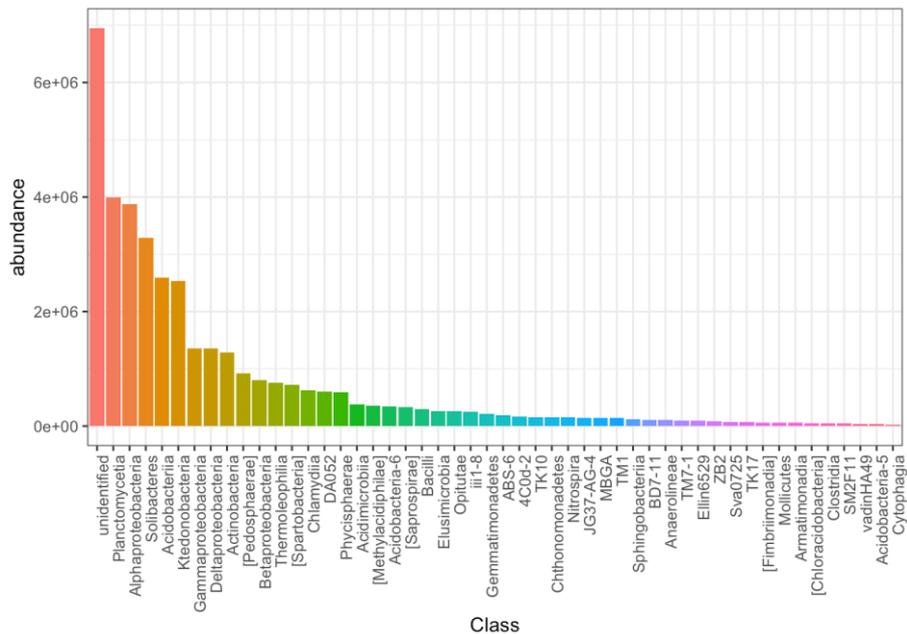


Abbildung 29. Taxonomische Zusammensetzung der Bakterien auf Klassenebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen.

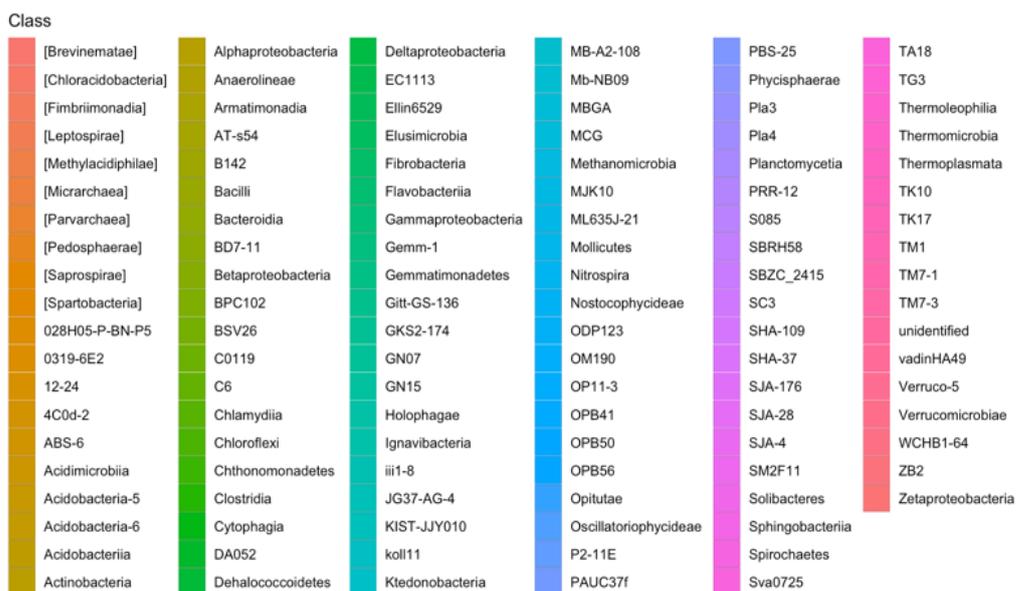
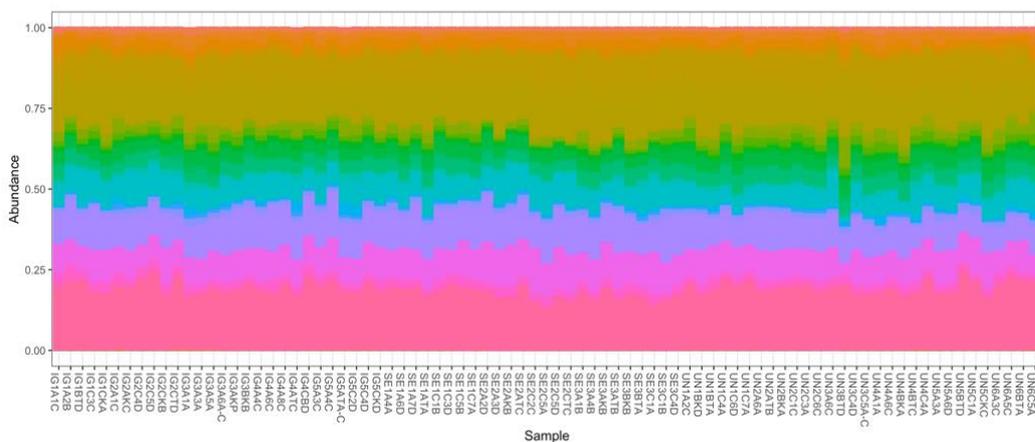


Abbildung 30. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten auf Klassenebene. Die Säulenhöhen zeigen den Anteil eines jeden Samples zu den sequenzierten Klassen. Bakterien die nicht zuordenbar waren, wurden nicht berücksichtigt.

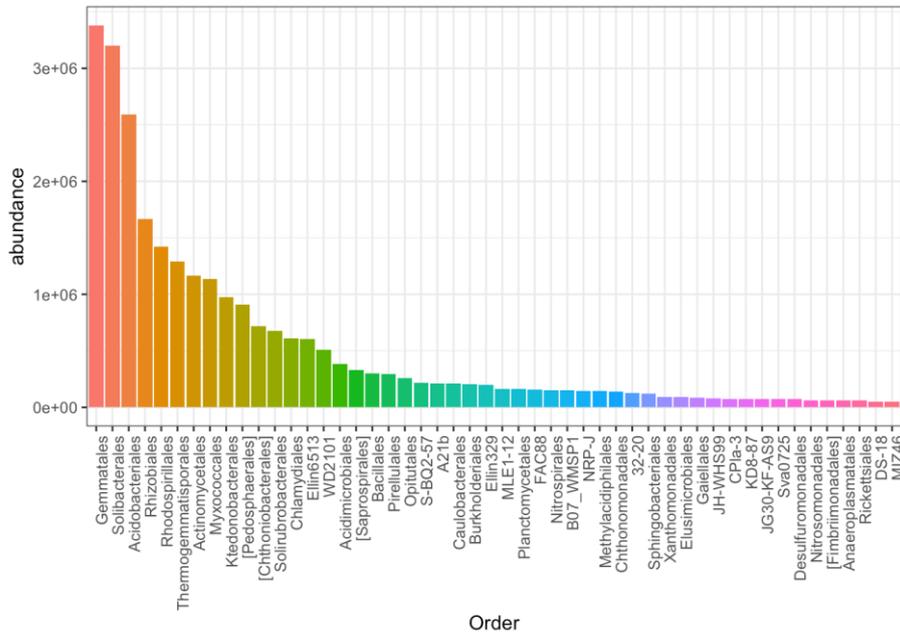


Abbildung 31. Taxonomische Zusammensetzung der Bakterien auf Ordnungsebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, wurden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.

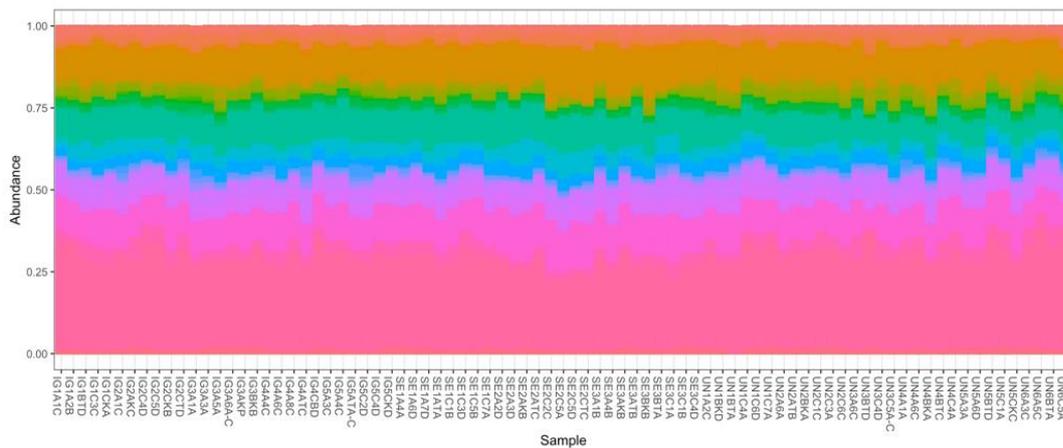


Abbildung 32. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten auf Ordnungsebene. Die Säulenhöhen zeigen den Anteil eines jeden Samples zu den sequenzierten Ordnungen. Bakterien die nicht zuordenbar waren wurden nicht berücksichtigt.

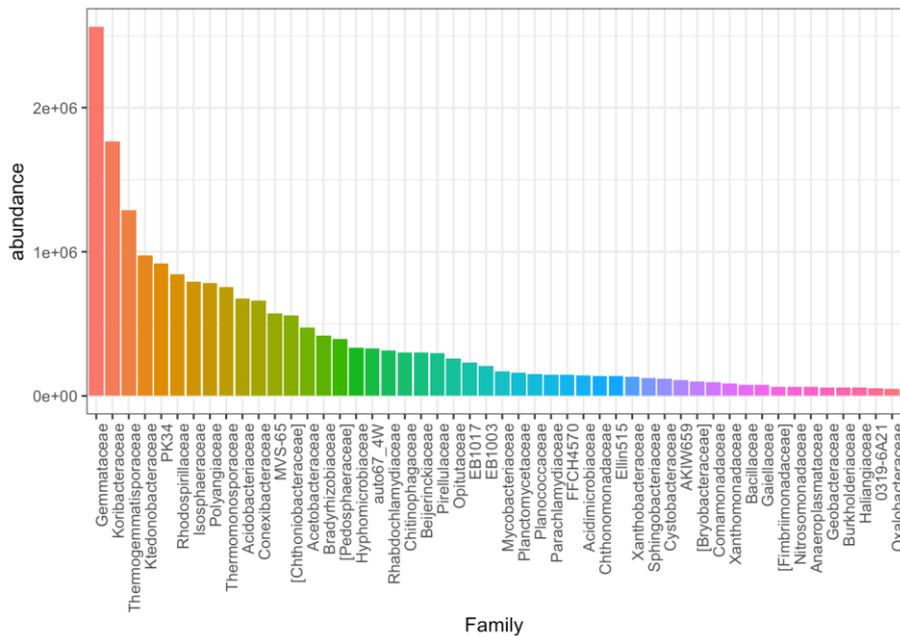


Abbildung 33. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten-Datensatzes auf Familien-Ebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.

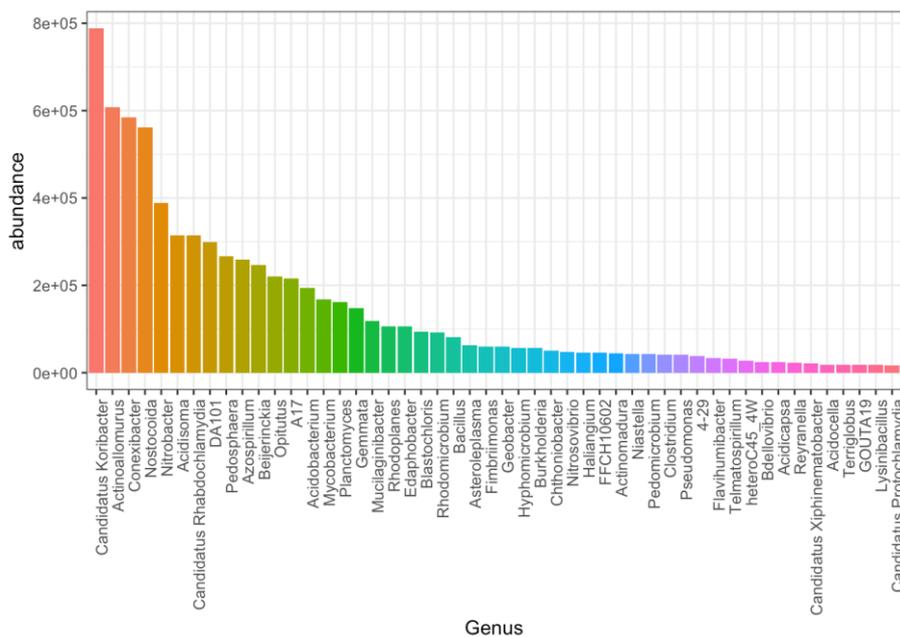


Abbildung 34. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten-Datensatzes auf Genus-Ebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.

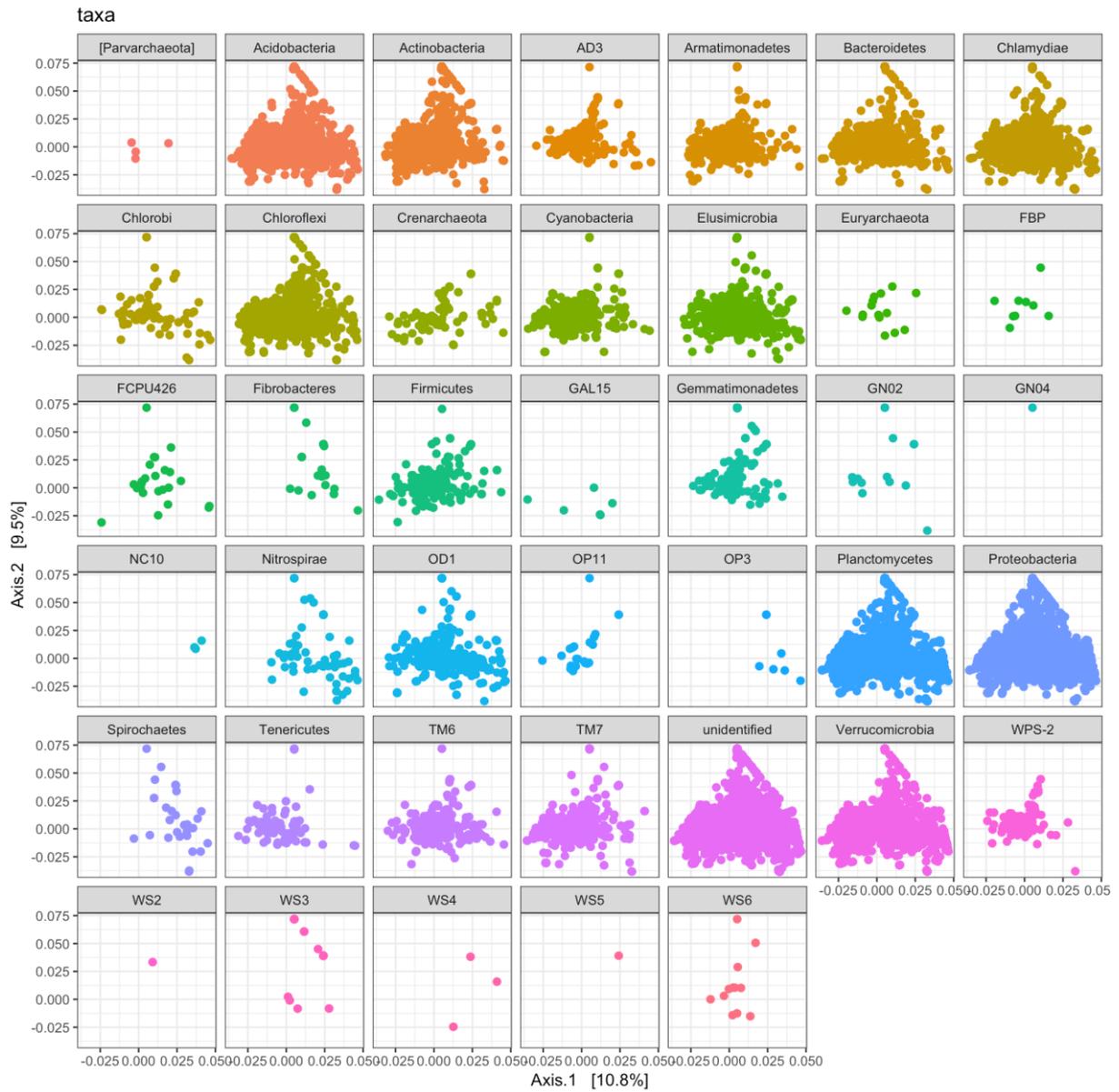


Abbildung 35. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Ergebnisse aus der MDS Ordination auf den ersten beiden Achsen, basierend auf Unifrac Distanzen. Die Punkte in den Plots reflektieren die Platzierung der individuellen Samples nach ihrer Ähnlichkeit. Farben entsprechen der taxonomischen Zuordnung auf Phylumebene.

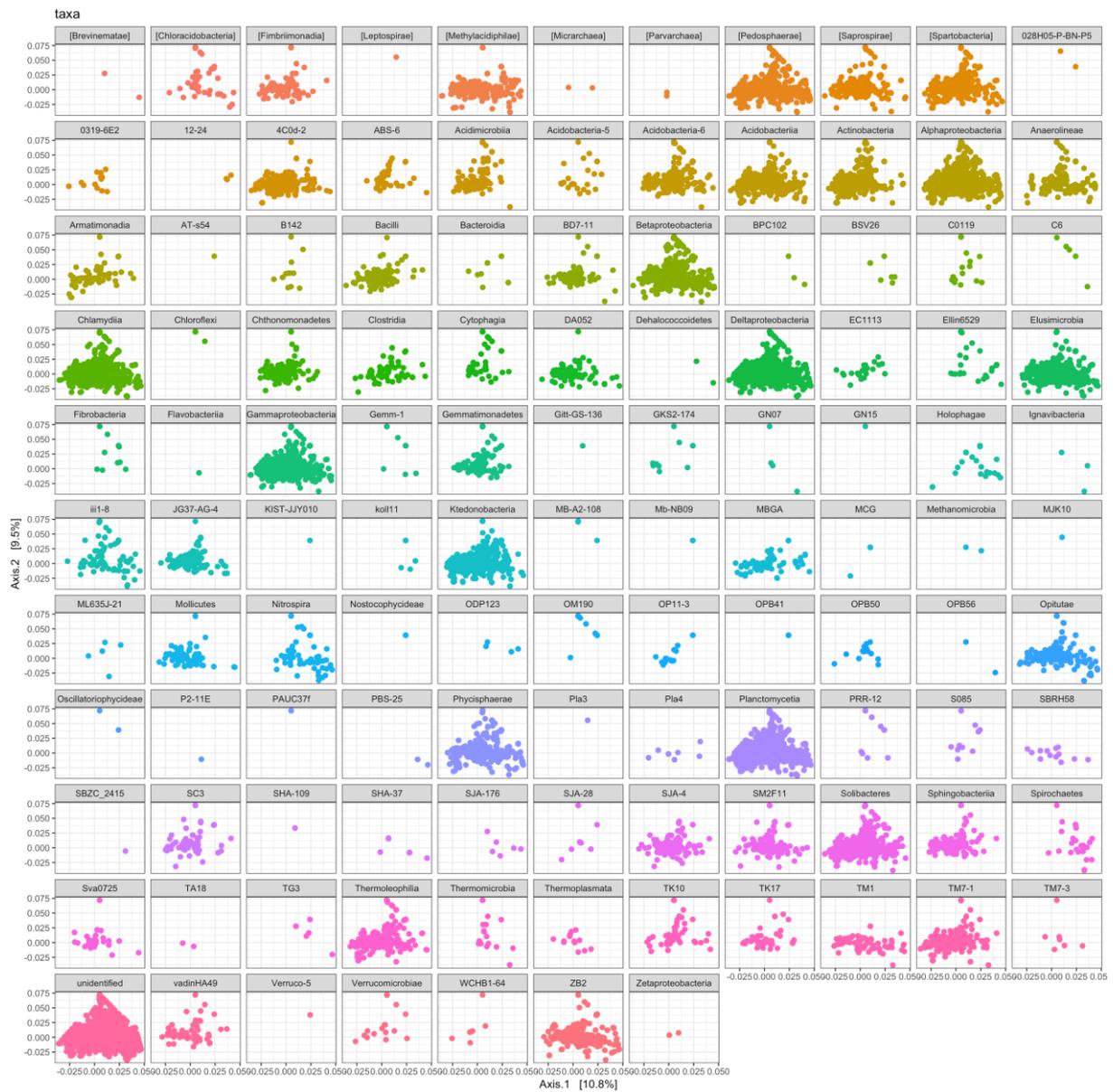


Abbildung 36. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Ergebnisse aus der MDS Ordination auf den ersten beiden Achsen, basierend auf Unifrac Distanzen. Die Punkte in den Plots reflektieren die Platzierung der individuellen Samples nach ihrer Ähnlichkeit. Farben entsprechen der taxonomischen Zuordnung auf Klassenebene.

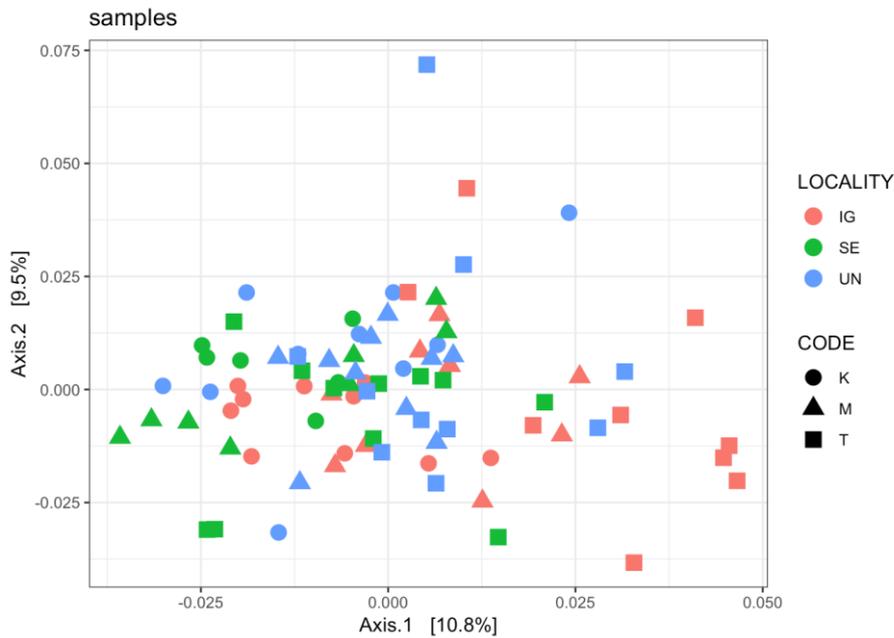


Abbildung 37. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Resultate der MDS Ordination auf den ersten beiden Ordinationsachsen, basierend auf Unifrac Distanzen. Die Punkte in den Plots reflektieren die Platzierung der individuellen Samples nach ihrer Ähnlichkeit. Farben stehen für Lokalität und Formen für Position im Gradient (K,M,T).

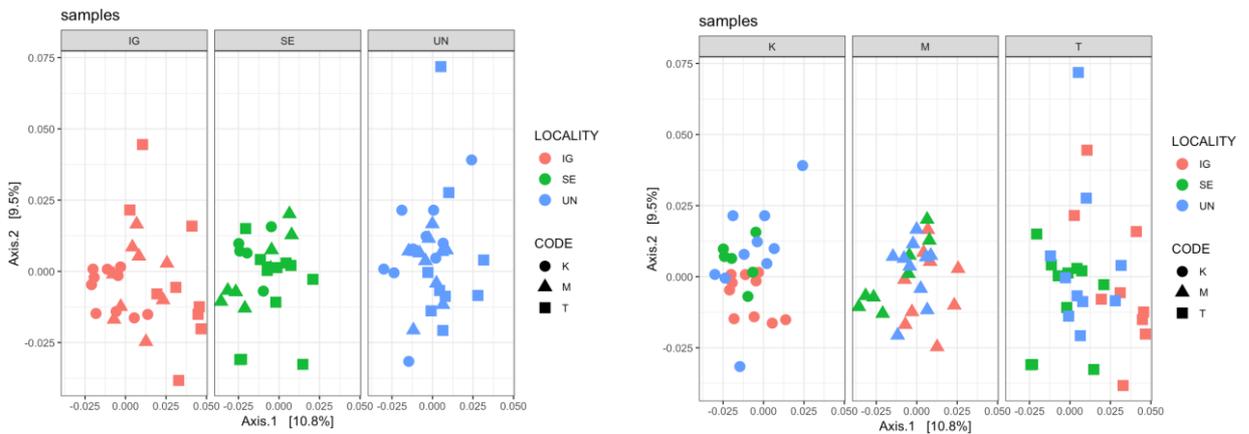


Abbildung 38. Graphische Repräsentation der Ergebnisse der MDS Ordination des Bakteriendatensatz, anhand der ersten beiden Ordinationsachsen und basierend auf Unifrac Distanzen. Links, die Abbildung unterteilt nach den Lokalitäten, rechts nach ihrer Position im ökologischen Gradienten. Die Punkte platzieren die Samples entsprechend ihrer Ähnlichkeit in einer zweidimensionalen Präsentation. Farben stehen für Lokalität und Formen für Position im Gradient (K,M,T).



j. OTU Reichhaltigkeit und Diversität im Prokaryotendatensatz

Die Diversität von OTUs auf dem Niveau der Samples wurde mit den gleichen 6 Indices ermittelt, die wir schon beim Pilzdatensatz herangezogen haben. Alle Metriken zeigen einen Abnahme der OTU Reichtum und Diversität gegen die tiefen, pesimalen Anteile des ökologischen Gradienten. Der übergreifende Trend ist in den Boxplots der Abbildung 39 zu sehen, und ist auch für die einzelnen Sammellokalitäten zu erkennen (Abbildung 40).

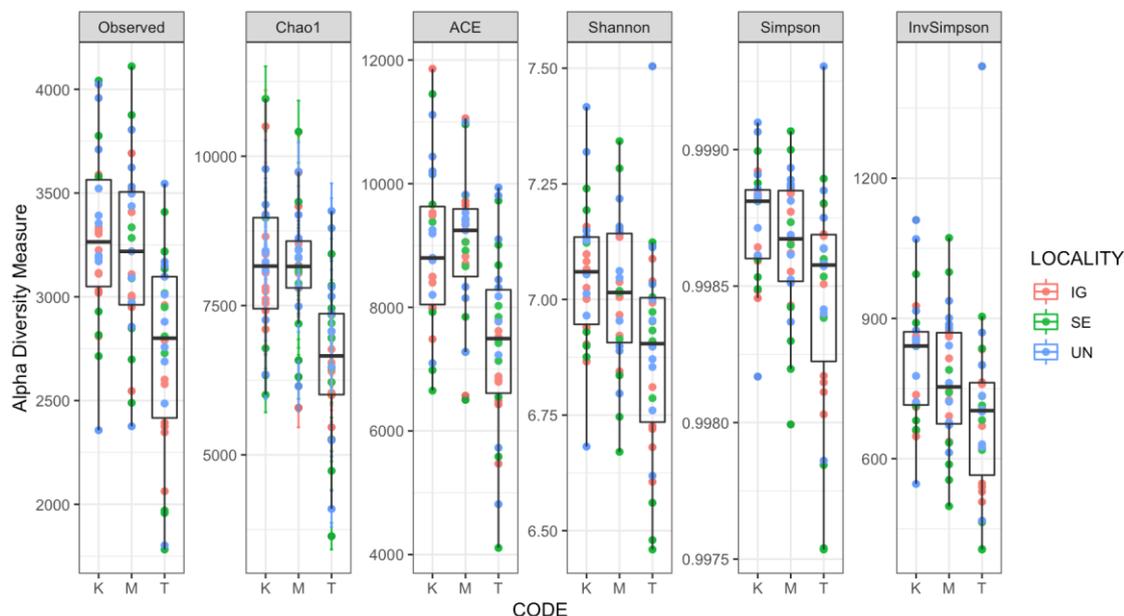


Abbildung 39. Prokaryotendatensatz. Graphische Darstellung der Muster von OTU richness und Diversität für die drei Positionen im ökologischen Gradienten (K,M,T). Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquantilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.

k. Modellierung der Prokaryotendiversität

Das gleiche methodologische Gerüst wie im Pilzdatensatz wird verwendet, um das Muster des OTU-Reichtums und der Diversität zu beschreiben. Wir überprüften zuerst Normalität und Heteroskedastizität der Indices mit den Samples und untersuchten sie dann mittels linear gemischter Modelle. Nur der inverse Simpson Index weichte signifikant von der Normalverteilung ab (Tabelle 12). Unter Verwendung einer Kruskal-Wallis Einweg Rang ANOVA zeigten alle Diversitätsindices signifikante Unterschiede (Tabelle 13). Der Bartlett's Test weist jedoch auf Heteroskedastizität beim Simpson Diversitätsindex hin, was die Verwendung von linear gemischten Modellen erschwert (Tabelle 14).

Wilcoxon's Test (Tabelle 15) zeigte, dass die oberen und mittleren Anteile des Gradienten unabhängig vom verwendeten Index keine signifikanten Unterschiede in der Diversität aufwiesen, aber dass der untere Teil des Gradienten (Pessimum) durch signifikante Divergenz in Reichtum und Diversität gekennzeichnet ist.

Etwas abweichend davon zeigte die Untersuchung mit einem linear gemischten Modell, dass es zwar auch eine signifikante Abnahme im OTU Reichtum gegen die pessimalen Bereiche gibt, diese jedoch nicht mit einer signifikanten Abnahme der Diversität der bakteriellen Gemeinschaften verbunden ist (Tabelle 16–18). Das kann bedeuten, dass dort weniger OTUs insgesamt auftraten, aber dass ihre Verteilung gleichmäßiger ist. Das Ergebnis könnte jedoch auch durch die beobachtete Heterogenität der Varianzen verzerrt werden, was möglicherweise die Verwendung flexiblerer verallgemeinerter linearer Modelle mit gemischten Effekten erforderlich macht.



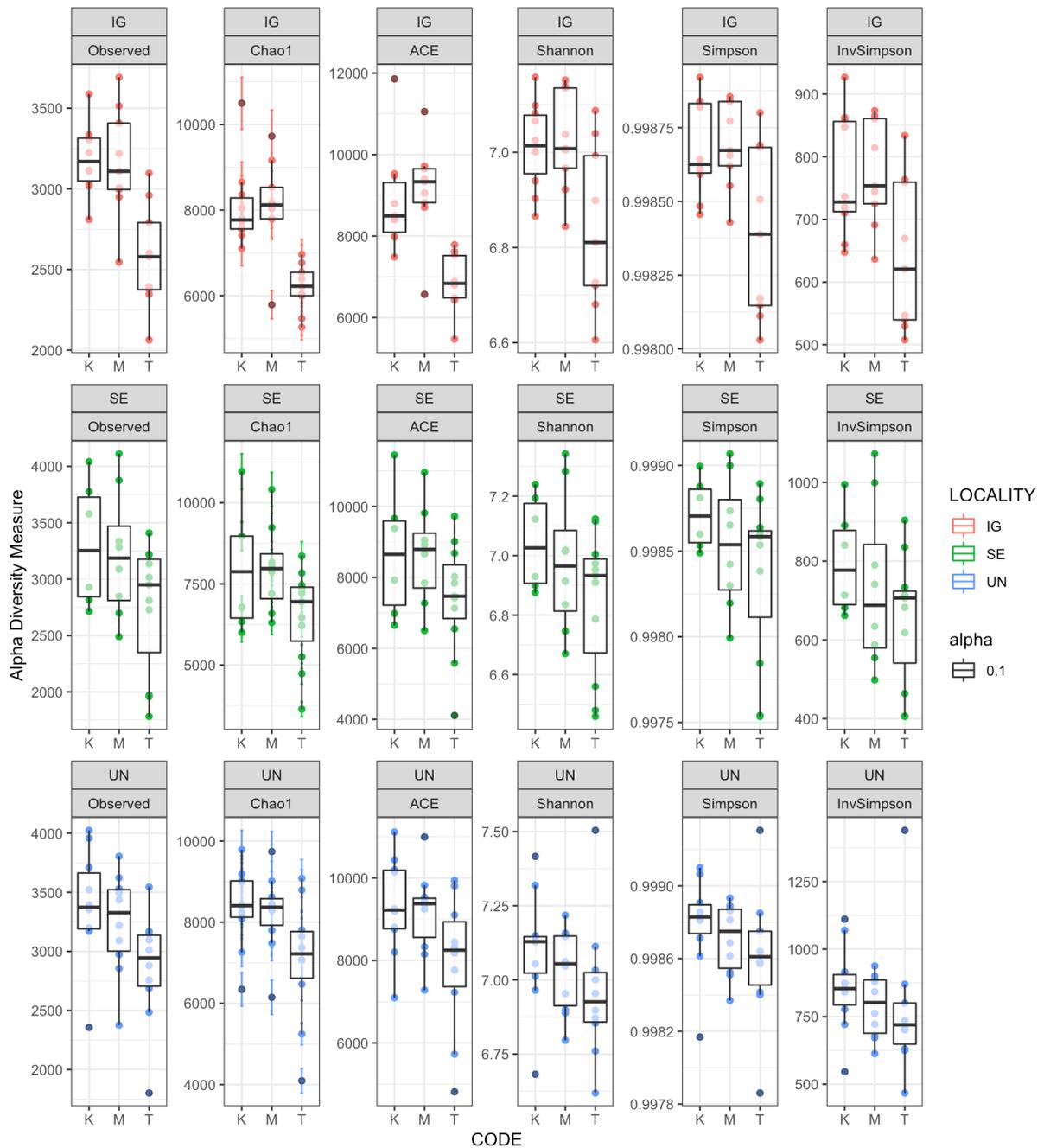


Abbildung 40. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Muster von OTU Reichhaltigkeit und Diversität in den drei Positionen des Gradienten (K,M,T), jeweils separiert nach Lokalität. Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquantilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.

**Tabelle 12.** Normalitätstest der Diversitäts-Estimatoren im 16S Datensatz Shapiro-Wilk Test auf Normalität.

	Beobachtet	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
statistic	0.9815	0.9899	0.9894	0.9827	0.9220	0.9557
p.value	0.2788	0.7748	0.7384	0.3291	8.8427	0.0060

Tabelle 13. Heteroskedastizität der Diversitäts-Estimatoren im Prokaryoten-Datensatz mittels Kruskal-Wallis Rangsummentest.

	Beobachtet	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
parameter	2	2	2	2	2	2
statistic	19.402	23.281	19.652	12.666	10.460	10.460
p.value	6.1197	8.7981	5.4014	0.0017	0.0053	0.0053

Tabelle 14. Heteroskedastizität der Diversitäts-Estimatoren im Prokaryoten-Datensatz mittels Bartlett's Test auf Homogenität der Varianzen.

	Beobachtet	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
parameter	2	2	2	2	2	2
statistic	0.5974	0.6931	0.9791	4.2838	11.821	4.9948
p.value	0.7417	0.7071	0.6128	0.1174	0.0027	0.0822

Tabelle 15. Unterschiede in der statistischen Verteilung von Reichhaltigkeits- und Diversitätswerten im Prokaryotendatensatz zwischen Positionen im Gradienten. Wilcoxon Rangsummentest. Die Werte in den Tabellen repräsentieren die adjustierte Holm-Wahrscheinlichkeit, dass Diversität und Reichhaltigkeit für die K,M,T Positionen im Gradienten zur gleichen Verteilung gehören.

	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
KM	0.4766	0.9788	0.7709	0.4527	0.4634	0.4634
KT	0.0001	5.1123	0.0002	0.0019	0.0039	0.0039
MT	0.0017	3.3083	0.0001	0.0164	0.0543	0.0543



Tabelle 16. Einfluss der Position im Gradienten auf Reichhaltigkeits- und Diversitätsmaße im Prokaryotendatensatz. Linear gemischte Modelle mit Lokalitäten als Blöcke und Samplingintensität als Kovariate.

	<i>Dependent variable:</i>					
	Observed	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	InvSimpson
Slope	-78.878*** (28.585)	-397.064*** (135.814)	-385.713** (157.628)	0.003 (0.008)	-0.00000 (0.00002)	14.103 (9.579)
Intensity	2,186.696*** (118.796)	4,383.058*** (564.417)	4,440.798*** (655.073)	0.949*** (0.033)	0.001*** (0.0001)	773.034*** (39.898)
Constant	2,228.334*** (96.358)	6,403.391*** (457.814)	7,194.730*** (531.348)	6.540*** (0.027)	0.998*** (0.0001)	371.436*** (33.535)
Observations	83	83	83	83	83	83
Log Likelihood	-556.135	-685.482	-697.845	124.234	614.077	-466.443
Akaike Inf. Crit.	1,122.270	1,380.963	1,405.689	-238.468	-1,218.154	942.885
Bayesian Inf. Crit.	1,134.365	1,393.057	1,417.783	-226.374	-1,206.060	954.980

Note: * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$

Tabelle 17. Einfluss der Position im Gradienten auf Reichhaltigkeits- und Diversitätsmaße im Prokaryotendatensatz. Zusammenfassung von Null-Modellen mit Lokalitäten als Blöcke und Samplingintensität als Kovariate.

	<i>Dependent variable:</i>					
	Observed (1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Intensity	2,314.440*** (114.312)	5,026.115*** (545.904)	5,065.472*** (624.666)	0.944*** (0.030)	0.001*** (0.0001)	750.432*** (37.251)
Constant	2,008.633*** (56.708)	5,297.434*** (270.815)	6,120.390*** (309.888)	6.548*** (0.016)	0.998*** (0.00005)	410.662*** (20.417)
Observations	83	83	83	83	83	83
Log Likelihood	-559.778	-689.549	-700.735	124.157	614.069	-467.511
Akaike Inf. Crit.	1,127.555	1,387.098	1,409.471	-240.315	-1,220.137	943.023
Bayesian Inf. Crit.	1,137.231	1,396.774	1,419.146	-230.639	-1,210.462	952.698

Note: * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$



Tabelle 18. Unterstützung für den Einfluss der Position im Gradient auf die Diversitätsmaße des Prokaryotendatensatzes. Zusammenfassung der ANOVA Vergleiche zwischen Null und vollständigen Modellen.

	Df	AIC	BIC	logLik	deviance	Chisq	Chi Df	Pr(> Chisq)
Observed.null	4	1,127.555	1,137.231	-559.778	1,119.555			
Observed	5	1,122.270	1,134.365	-556.135	1,112.270	7.285	1	0.007
Chao1.null	4	1,387.098	1,396.774	-689.549	1,379.098			
Chao1	5	1,380.963	1,393.057	-685.482	1,370.963	8.135	1	0.004
ACE.null	4	1,409.471	1,419.146	-700.735	1,401.471			
ACE	5	1,405.689	1,417.783	-697.845	1,395.689	5.782	1	0.016
Shannon.null	4	-240.315	-230.639	124.157	-248.315			
Shannon	5	-238.468	-226.374	124.234	-248.468	0.153	1	0.695
Simpson.null	4	-1,220.137	-1,210.462	614.069	-1,228.137			
Simpson	5	-1,218.154	-1,206.060	614.077	-1,228.154	0.017	1	0.897
InvSimpson.null	4	943.023	952.698	-467.511	935.023			
InvSimpson	5	942.885	954.980	-466.443	932.885	2.137	1	0.144

I. Assoziationen im Prokaryotendatensatz

Die Assoziation zwischen OTUs und taxonomischen Gruppen von OTUs mit den verschiedenen Anteilen des ökologischen Gradienten wurde unter Verwendung der gleichen Methode untersucht, die auch für den Pilzdatensatz zur Anwendung kam.

In einer ersten Analyse testeten wir das unterschiedliche Vorhandensein von Amplikons auf OTU-Ebene zwischen der oberen (K) und der unteren Fraktion (T) des Gradienten. Dann haben wir das unterschiedliche Vorhandensein von Amplicons getestet, die in taxonomischen Niveaus von Gattung und Ordnung aggregiert sind. (Abbildungen 41-43). Die Gesamttendenzen sind stärker als im Pilzdatensatz. Im Allgemeinen sind die unteren Bereiche der Transekte mit Bakterien angereichert, die mit mineralischen oligotrophen, und wässrigen Umgebungen in Verbindung gebracht werden können. Dazu zählen die Actinobacteria *Gaiella*, *Actinomadura* und *Actinoallomurus*, sowie die Acidobacteria *Edaphobacter* und *Terriglobus* oder solche, die mit Planctomyceten-Gruppen Gemmata oder Nostocoida verwandt sind. In die gleiche Richtung weist die Häufigkeit von Candidatus *Rhodochlamydia*, die intrazelluläre Parasiten von Isopoden und Insekten sind. Andererseits enthält der obere Teil des Gradienten OTUs, die eher mit trockeneren Böden assoziiert sind, wie Verrucomicrobia *Pedosphaera* oder die chemolitotrophe Gattung *Rhodomicrobium*. Auch mineralische und CO oxidierende Bakterien wie *Koribacter* oder *Geobacter* sind vorhanden (Abbildung 41).

Ein ähnliches Muster bleibt bestehen, wenn OTUs auf Gattungsebene aggregiert wurden, obwohl sich das biotische Profil geringfügig unterscheidet. Denitrifizierende Rhodanobakterien (Proteobakterien), *Nocardia* und *Sporosarcina* sind für Habitate mit hohen Mengen an organischem Material charakteristisch. *Lysobacter* ist auch im Stickstoffkreislauf wichtig. *Luteimonas* ist eine ökologisch vielfältige Gattung innerhalb der Xanthomonadaceae, die häufig mit dem Abbau organischer Stoffe auf Böden in Verbindung gebracht wird. *Proteiniclasticum* ist typisch für Rinderpansen und *Coxiella* ist ein intrazellulärer Parasit, was auf eine deutliche Ansammlung von organischem Material hindeutet (Abbildung 43). Im oberen Teil des Gradienten spiegeln *Acidovorax*, *Desulfobacca*, *Terrimonas* oder *Pirellulla* eine typischere Gemeinschaft trockener oligotropher Böden, sowie mit Pflanzenwurzeln assoziierten Bakterien wider (Abbildung 43). Auf Ordnungsebene ergibt sich ein ähnliches Muster bei Nostocales und Phytoplasmen (Acholeplasmatales), Procabacteriales oder Actinomycetales sind vorherrschend im unteren Teil des Gradienten, während im oberen Teil des Gradienten die Lignocellulose abbauenden Roseiflexales mit der stärker entwickelten Vegetation korrelierend angereichert sind (Abbildung 42). Andere Gruppen chemoorganotropher Bakterien wie die Brevinematales und Caldilineales sind hier ebenfalls angereichert.



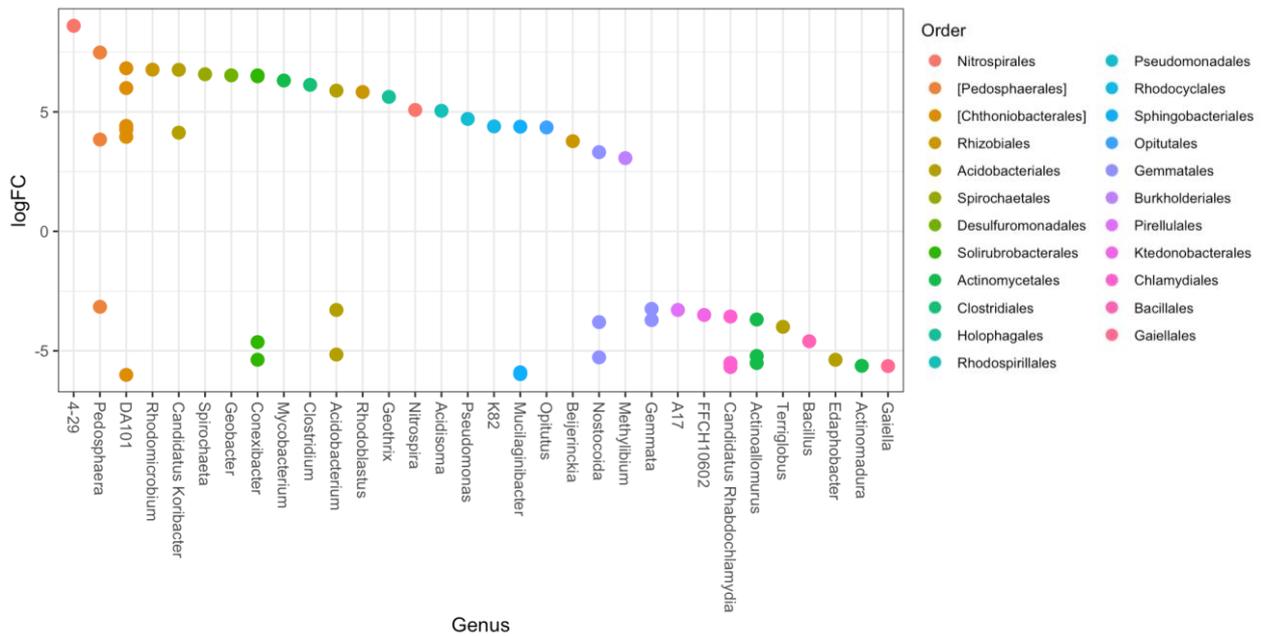


Abbildung 41. Datensatz der Prokaryoten. Abweichungen in der Sequenzhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion des Gradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind mit ihrer Zuordnung zu Ordnungen dargestellt. Nur jene OTUs mit einer Varianz größer als 10^4 wurden einbezogen, sowie nur hochsignifikante Vergleiche ($p < 0.001$).

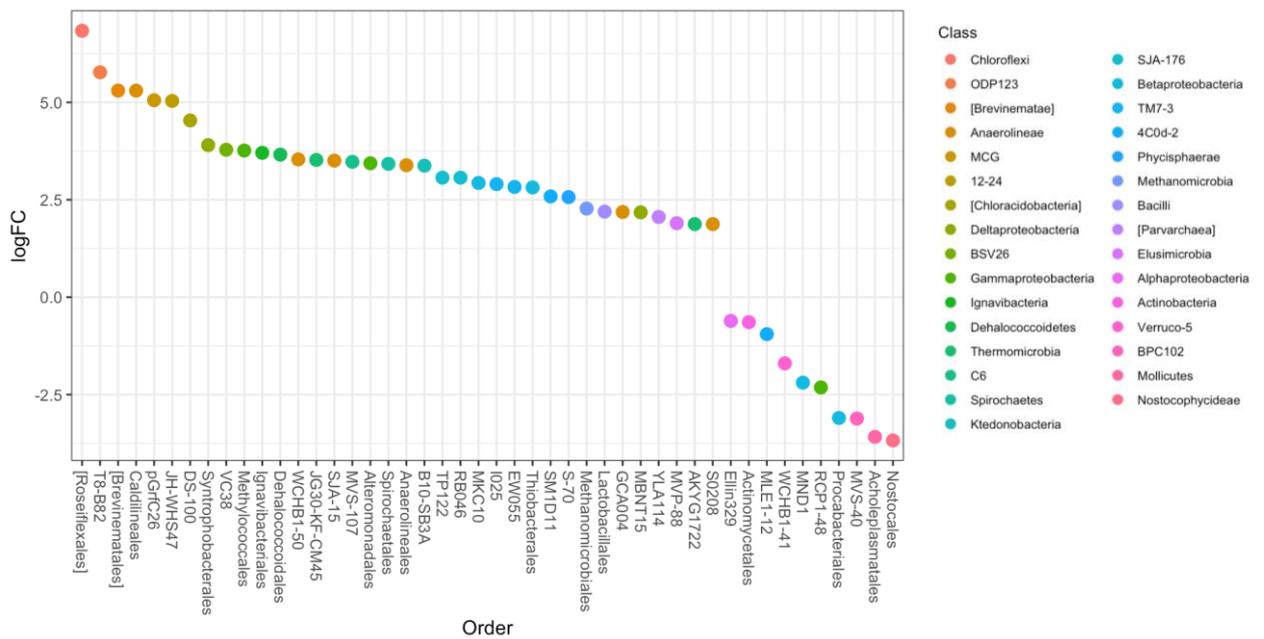


Abbildung 42. Datensatz der Prokaryoten. Abweichungen in der Sequenzhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion des Gradienten (K vs. T) mit OTUs, die zu Ordnungen aggregiert sind. Nur jene OTUs mit einer Varianz größer als 10^6 wurden einbezogen, sowie nur hochsignifikante Vergleiche ($p < 0.001$).

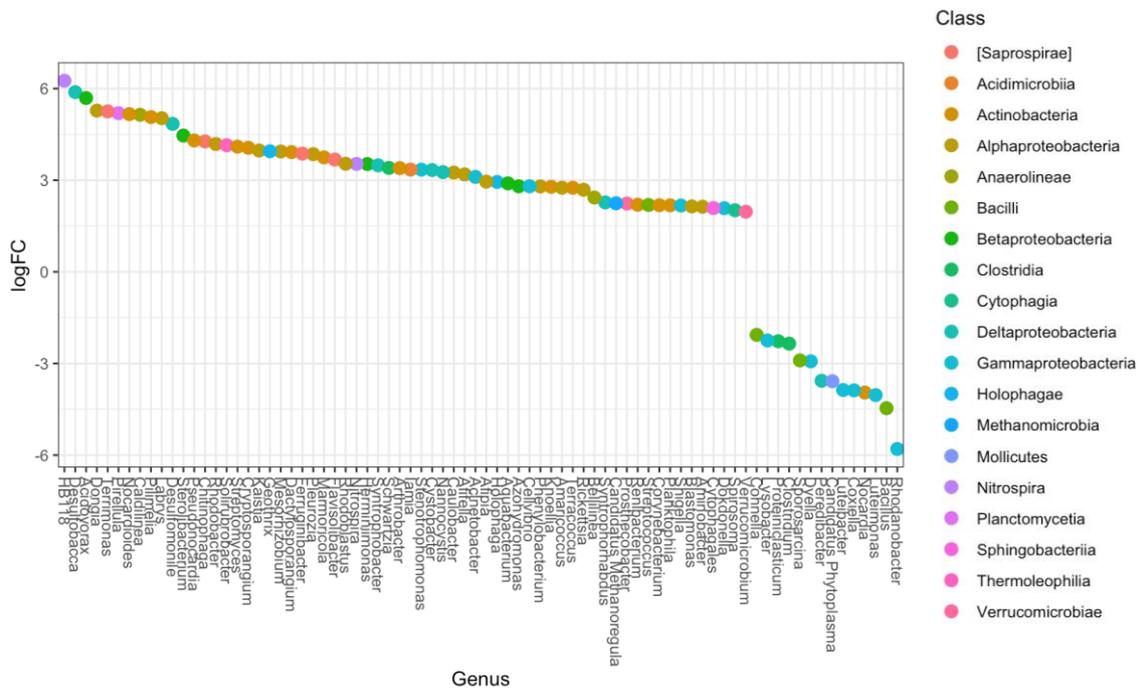


Abbildung 43. Datensatz der Prokaryoten Abweichungen in der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion des Gradienten (K vs. T) mit OTUs, die zu Gattungen aggregiert sind. Nur jene OTUs mit einer Varianz größer als 10^{-7} wurden einbezogen, sowie nur hochsignifikante Vergleiche ($p < 0.001$).

Interpretation und Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Darstellung der bodenassoziierte Pilz- und Bakteriengemeinschaften im Nationalpark gut geeignet ist, um die Funktionsweise der Bodenumgebung zu verstehen. Die Pilzgemeinschaft weist eine hohe Variabilität auf, die grobe Muster in den Transekten widerspiegelt. Während die Bakteriengemeinschaft deutlich komplexer ist, spiegelt sie mikroskopische Umgebungsbedingungen in den untersuchten Umgebungsgradienten stark wider.

Im Allgemeinen nimmt die bakterielle Vielfalt zu den unteren Bereichen der Transekte ab. Diese Abnahme der Diversität geht einher mit einem Ersatz der biotischen Struktur der Gemeinschaft. Die Schneebettproben weisen deutlich mehr Bakterien auf, die mit nassen und überfluteten Böden assoziiert sind, während der obere Teil eine komplexere Gemeinschaft mit pflanzenassoziierten bio- und saprotrophen Bakterien aufweist. Gleichzeitig weist der niedrigere Anteil des Gradienten auch eine größere Menge an generalistischen humicolous Saprotrophen auf.

Der vorgeschlagene Umweltgradient hat offensichtlich die Übereinstimmung zweier hauptsächlich ökologischer Faktoren. Auf der einen Seite gibt es ein Reifegrad- und Stressgefälle, das durch die Ansammlung von Schnee und die Beständigkeit auf den Talsohlen verursacht wird. Auf der anderen Seite erfasst der Gradient einen für Steigungen typischen mikrotopographischen Gradienten mit einer oberen Wiederaufladungszone, einer Strömungszone und einer unteren Entladungszone. In unserem Fall blockieren die Schneebetten wahrscheinlich den Wasserfluss ausreichend, um eine lokale Ansammlung von organischem Material und Mineralien zu verursachen, die von den oberen Abschnitten der Hänge gespült werden. Die Anzahl der OTUs und Taxa, die mit dem unteren Teil des Gradienten assoziiert sind, ist relativ klein und deutlich, während die mit der oberen Fraktion assoziierten viel breiter und weniger häufig sind.

Die Studie beschränkt sich darauf, wie repräsentativ die gesammelten Proben sind und inwieweit sie als Wiederholungen behandelt werden können. Wir haben uns dazu entschlossen, keine gepoolten Samples zu verwenden, sondern eine individualisierte Sequenzierung pro Diagramm und die einzelnen Bibliotheken als Replikate. Dies ist insofern genauer, als es eine weitere Integration mit den Daten ermöglicht, die mit anderen Methoden erhalten wurden, aber es übertrifft geringfügige Abweichungen, die möglicherweise von geringer ökologischer Relevanz sind. Dies ist besonders deutlich im Pilzdatensatz, dessen Arten größere mikroskopische Nischen als die prokaryotischen Organismen einnimmt.

Die Studie ist auch durch die Fähigkeit eingeschränkt, die sequenzierten Amplicons richtig zu identifizieren, wodurch die erhaltenen Informationen zusammenfallen. Diese Tendenz wird jedoch im Verlauf der langfristigen Überwachung weniger stark sein, da sich auch die Datenbanken weiterentwickeln und die taxonomische Abdeckung erhöhen werden. Während die Amplicon-Sequenzierungsmethode gleich bleibt, sind die erhaltenen Daten für lange Zeit vergleichbar. Eine viel teurere, aber gründlichere Alternative wäre gewesen, das gesamte Metagenom und das Metatranskriptom pro Probe zu sequenzieren. Dieses Verfahren hat eine kohärentere Repräsentation sichergestellt, weniger voreingenommen und weniger beeinflusst durch die methodische Verzerrung, die durch die Verwendung von PCR-basierter Amplicon-Sequenzierung eingeführt wird. Es hätte auch einen tieferen Einblick in die funktionale Zusammensetzung der sequenzierten Gemeinschaften ermöglicht. Die Sequenzierungskosten sind derzeit noch unerschwinglich, für Langzeitüberwachungen kann es jedoch interessant sein, beide Methoden zu koppeln, um eine umfassende Stichprobe mit Metabarkodierung zu erhalten, und detaillierte Funktionsanalysen des Gengehalts basierend auf der genomweiten Sequenzierung. Der letztere Fall kann vereinfacht werden, indem die Anzahl der Stichproben reduziert oder Replikate auf Lokaltätsebene zusammengefasst werden.

Wir haben die mikrobiellen Bodengemeinschaften nur einmal erprobt, und wir erwarten nicht, dass zwischen den aufeinanderfolgenden Jahren viele grundlegende Schwankungen zu beobachten sind. Es ist jedoch möglich, dass die Dominanz verschiedener Bakterienarten sogar einem saisonalen Zyklus folgt und teilweise von den klimatischen Bedingungen abhängt, die sich mit den Jahren verändern können. Mangels wiederholte Messungen haben wir immer noch nicht die Methodik entwickelt, um Veränderungen im Laufe der Zeit in die Gemeinschaftsstruktur zu integrieren. Wir sind daher überzeugt, dass wiederholte Beprobungen in den nächsten Jahren ein solides multidimensionales Rahmenwerk zu entwickeln hilft, dass die Interpretation von Gemeinschaftsveränderungen entlang der Transekte ermöglicht.

Ausblick

a. **Aussagewert für das Testgebiet und Aussagewert für das gesamte Schutzgebiet**

An dieser Stelle möchten wir auf den Aussagewert des Moduls 4 (Mikrobiologie) eingehen und das Gesamtprojekt damit in Verbindung bringen. Mit unserem Beitrag ist für das Nationalparkgebiet das erste Mal die mikrobielle Seite der Biologie in ein Projekt mitaufgenommen worden. Die Betrachtung der mikrobiellen Gemeinschaften ergänzt die Erhebungen der terrestrischen Module, und zeigt, dass eine erhöhte Vielfalt dieser Organismen mit der Ausprägung und Produktivität der Vegetation einhergeht. Insgesamt zeigt sich, dass die Diversität der Mikroorganismen jene der höheren Pflanzen und der Bodentiere um Größenordnungen übertrifft. Nur ein einziges anderes Projekt ist uns bekannt, bei dem zumindest für spezielle Habitats ebenfalls auf die Umweltmikrobiologie geachtet worden ist. Das EU-ERA Projekt SCIN zur Untersuchung biologischer Bodenkrusten hat mit Projekt-Mitwirkung von Martin Grube als Partner zuvor am Hochtor einen Untersuchungsstandort gehabt. Dabei sind in der Umgebung der biologischen Bodenkrusten auch begleitende Pilz- und Bakteriengemeinschaften untersucht wurden. Dieses Projekt hatte jedoch andere zugrundeliegende Fragestellungen. Mit der Berücksichtigung der mikrobiologischen Seite trägt der Nationalpark Hohe Tauern dem Umstand Rechnung, dass in der biologischen Forschung zusehends die wichtige Rolle der Bodenmikroorganismen für die Vegetation und Stabilität von Ökosystemen erkannt wird. Mikroorganismen reagieren auf der anderen Seite sehr empfindlich auf veränderte Umweltbedingungen. So eignen sich Verschiebungen in den mikrobiellen Gemeinschaften im Naturschutz als Frühwarnsystem von



Umweltveränderungen, die sich erst später auf andere Organismengruppen auswirken. Wir haben mit dem gegenständlichen Projekt allerdings dafür erst die notwendigen Basisdaten geliefert. Veränderungen lassen sich erst in den Folgebeprobungen feststellen.

b. Einbettung in internationale Forschungsnetzwerke

Weltweit gibt es weder vergleichbare Initiativen zur Untersuchung von Bodenmikroorganismen in Langzeitmonitoringprojekten noch ein vergleichbares Sampling entlang eines ökologischen Gradienten in den Hochlagen. Die vorliegende Untersuchung hat daher einen sehr hohen Wert für die Umweltmikrobiologie, sowohl in Österreich als auch international. Das ist vor allem auch dem Untersuchungsdesign zu verdanken. Hier haben wir mit der Verknüpfbarkeit unserer Daten mit jenen aus anderen Modulen eine weltweit absolut einzigartige Forschungsgrundlage. Der Wert der gemeinsamen Beprobung durch Spezialisten verschiedener Fachgebiete kann nicht hoch genug eingeschätzt werden. Mit den hier geschaffenen Basisdaten, und vor allem mit dem Vergleich der in anderen Modulen gewonnenen Informationen zu den beprobten Standorten werden wir in der Lage sein, mit entsprechenden Publikationen die Rolle des Nationalparks Hohe Tauern als Ort der Forschung in der internationalen Wissenschaftsgemeinschaft deutlich anzuheben. Derzeit laufen auch weltweite Programme zum mikrobiologischen Vergleich von Bodenproben. Vor der Befriedigung internationaler Interessen, Daten aus dem Projekt einfließen lassen, steht für uns aber, dass die Ergebnisse dem Nationalpark Hohe Tauern selbst im bestmöglichen Sinne zu Gute kommen.

Kosten-Analyse

Die Gesamtkosten der derzeitigen Methodik sind relativ gering. Die gesamte Studie kostete ca. 18.000 €, von denen 12.000 für die Vorbereitung und Sequenzierung von Bibliotheken verwendet wurden, der Rest für Feldarbeiten und Laborbedarf, sowie für Berichterstellung. Die Kosten für die Sequenzierung könnten reduziert werden, indem die Bibliotheksvorbereitung nicht extern durchgeführt wird. Dies erhöht jedoch auch die damit verbundenen persönlichen Kosten auf Seite der Forschungseinrichtung. Die persönlichen Kosten sind jedoch in viel zu geringem Ausmaß im Budget enthalten. Sie wurden als Eigenleistung des universitären Partners im Projekt zur Verfügung gestellt und beinhalten einige Arbeitszeiten durch Labortechniker und eine erhebliche Zeit für die Datenaufbereitung und Datenanalyse. Weil wir feststellen mussten, dass die Analysen in dieser Genauigkeit mit den in der Wissenschaft gängigen Verfahren nicht möglich waren, mussten entsprechende Analyseprotokolle in diesem Projekt erst entwickelt werden. Dieser Aufwand war vorab nicht einschätzbar. Die Auswertung, ihre methodologische Entwicklung und die Datenanalyse repräsentieren etwa ein Jahr exklusiver Arbeit eines erfahrenen Forschers, der sowohl als Datenanalyst als auch als Mykologe und Mikrobiologe erfahren sein muss, um die biologische Bedeutung der beobachteten Muster zu interpretieren.

Nachdem die bis jetzt entwickelten Analyseprotokolle den methodischen Rahmen festgelegt haben, wird die Arbeitsbelastung in Bezug auf das Zusammenstellen von Datensätzen und das Errechnen von Ergebnissen geringer sein. Die Computerauslastung bei der Datenanalyse werden jedoch mit jeder neuen Datenerfassungsrunde erheblich ansteigen. Dies müsste bei Wiederholungen der Beprobungen unbedingt berücksichtigt werden. Eine langfristige Fortführung des Projektes macht auf jeden Fall Sinn mit entsprechenden Intervallen der Untersuchungen. Eine Wiederholung nach etwa 4 Jahren ist unserer Ansicht nach erforderlich, um etwaige Abweichungen festzustellen. Diese Untersuchung wird daher auch Rückschlüsse liefern, in welchen Abständen eine Wiederholung im Sinne des Langzeitmonitorings zielführend wäre. Wir würden auf jeden Fall eine Wiederholung des mikrobiologischen Samplings für notwendig erachten, sollten sich klare Änderungen in anderen Modulen des Langzeitmonitorings abzeichnen, die die Gradienten an den gleichen Stellen beproben.



Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.** Schematische Darstellung der bioinformatischen Analyseabfolge (Analytic Pipeline), die für dieses Projekt eigens entwickelt wurde. Dateien, auf die jeweils ein Dateiname verweist, sind online verfügbar in einem dafür vorgesehenen öffentlich zugreifbaren gitHub-Repository. Der Hauptpfad der Verarbeitung, der für die Verarbeitung aller Proben gemeinsam gilt, ist farblich hervorgehoben. Namen in Kursivschrift markieren die wichtigsten resultierenden Datenstrukturen. Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung, Demultiplexierung und Trimmen der Adaptorsequenzen wurden von Microsynth GmbH durchgeführt. 4
- Abbildung 2.** Amplicon Sequenzierung der ITS Genregion von Pilzen. Sequenzierdichte der Samples. Die Säulenhöhen zeigen die Anzahl der Sequenzablesungen, hell gefärbte Fraktionen sind chimärische Ablesungen, die von einer weiteren Analyse ausgenommen werden mussten. Orange unterlegte Säulen sind unterrepräsentierte Samples die für die statistische Analyse ungeeignet waren (vier Samples von UN und zwei von IN; eines von einem Transekt-Kopf (K), zwei von der mittleren Region (M) und drei von Transekt-Tief (T)). 8
- Abbildung 3.** Einzigartigkeit der OTUs in der ITS Datenmatrix (chimärische Sequenzen sind ausgeschlossen). Jeder Punkt ist ein OTU entsprechend seiner Gesamtgröße (Gesamtzahl der Ablesungen in allen Samples) und die Zahl der Samples in welchem das OTU repräsentiert war. Die blau strichlierte Linie gibt den Medianwert der Samples in dem einzelne OTUs gefunden wurden. 8
- Abbildung 4.** Gestapelte Dichteprofile der Sequenziertiefe pro OTU im ITS Datensatz. Die Farbcodes trennen OTUs die nur in einem Sample gefunden wurden von jenen die häufiger auftraten. 9
- Abbildung 5.** Ampliconsequenzierung der variablen 16S rRNA Genregion von Bakterien. Sequenzierdichte der Samples. Die Säulenhöhen zeigen die Anzahl der Sequenzablesungen, hell gefärbte Fraktionen sind chimärische Ablesungen, die von einer weiteren Analyse ausgenommen werden mussten. Orange unterlegte Säulen sind unterrepräsentierte Samples die für die statistische Analyse ungeeignet waren (ein Sample von IN und einer von OB). 9
- Abbildung 6.** Einzigartigkeit der OTUs in der 16S Datenmatrix (chimerische Sequenzen sind ausgeschlossen). Jeder Punkt ist ein OTU entsprechend seiner Gesamtgröße (Gesamtzahl der Ablesungen in allen Samples) und die Zahl der Samples in welchem das OTU repräsentiert war. Die blau strichlierte Linie gibt den Medianwert der Samples, in dem die einzelnen OTUs gefunden wurden. 10
- Abbildung 7.** Gestapelte Dichteprofile der Sequenziertiefe pro OTU im Prokaryoten-Datensatz. Die Farbcodes trennen OTUs, die nur in einem Sample gefunden wurden, von jenen die häufiger auftraten. 10
- Abbildung 8.** Pilz-Datensatz (ITS Sequenzen). Anzahl gemeinsamer und exklusiver OTUs in den drei besammelten Lokalitäten (links) und in den drei Transekten aller Lokalitäten (rechts). 11
- Abbildung 9.** Taxonomische Zusammen-setzung des Pilzdatensatzes auf dem Niveau von Klassen. Die Säulen stellen die kumulative Häufigkeit der Sequenzablesungen dar. Sequenzen die nicht zugeordnet werden konnten wurden weggelassen. 14
- Abbildung 10.** Taxonomische Zusammensetzung der Pilze in den einzelnen Samples auf dem Niveau von Klassen. Die Säulen zeigen die Anteile der Samples an den Pilzklassen. OTUs für Pilze, die keiner Pilzklasse zugeordnet sind, wurden weggelassen. 14
- Abbildung 11.** Taxonomische Zusammensetzung des Pilzdatensatzes auf dem Niveau von Ordnungen. Hier werden nur die 40 häufigsten Taxa gezeigt. Die Säulen zeigt die kumulative Häufigkeit der Sequenzablesungen. Weil die Anzahl von – reads gegen niedrigere taxonomische Niveaus linear zunimmt, werden – reads von der Darstellung zugunsten der Klarheit ausgenommen. 15
- Abbildung 12.** Taxonomische Zusammensetzung der Pilze auf Ordnungsebene. Die Säulen zeigen die Anteile jeden Pilzsamples zugeordnet zu den Pilzordnungen. Sequenzen, die nicht zugeordnet werden konnten sind weggelassen. 15
- Abbildung 13.** Taxonomische Zuordnung des Pilzdatensatzes auf Familienebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen. 16
- Abbildung 14.** Taxonomische Zuordnung des Pilzdatensatzes auf Gattungsebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen. 16
- Abbildung 15.** Taxonomische Zuordnung des Pilzdatensatzes auf Artenebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen. 16



Abbildung 16. Graphische Darstellung der NMDS Ordination des Pilzdatensatzes (ITS). Die Resultate der beiden ersten Ordinationsachsen werden gezeigt. Die Punkte im Plot geben den Beitrag der verschiedenen OTUs zu jeder Achsenstreckung wieder, Farben entsprechen taxonomischen Divisionen.	17
Abbildung 17. Pilzdatensatz. Graphische Darstellung der NMDS Ordination mit zwei Ordinationsachsen. Punkte im Plot repräsentieren die Beiträge der verschiedenen OTUs zu jeder Achse. Facetten und Farben repräsentieren die taxonomische Zuordnung auf Klassenebene.	18
Abbildung 18. Pilzdatensatz. Detaillierte graphische Darstellung der NMDS Ordination mit drei Ordinationsachsen. Der linke Plot zeigt Achsen eins und zwei, während der rechte Plot die Achsen zwei und drei wiedergibt. Punkte im Plot stellen die Platzierung der Samples in der zweidimensionalen Projektion dar. Farben repräsentieren die Sampling-Lokalität und Formen die Position im Gradienten (K,M,T).	19
Abbildung 19. Pilzdatensatz. Detaillierte graphische Darstellung der NMDS Ordination mit drei Ordinationsachsen und unter Trennung der Samples nach Sampling-Lokalität. Der linke Plot zeigt Achsen eins und zwei, während der rechte Plot die Achsen zwei und drei wiedergibt. Punkte im Plot stellen die Platzierung der Samples in der zweidimensionalen Projektion dar. Farben repräsentieren die Sampling-Lokalität und Formen die Position im Gradienten (K,M,T).	19
Abbildung 20. Pilzdatensatz. Detaillierte graphische Darstellung der NMDS Ordination mit drei Ordinationsachsen und unter Trennung der Samples nach den Positionen im Gradienten. Der linke Plot zeigt Achsen eins und zwei, während der rechte Plot die Achsen zwei und drei wiedergibt. Punkte im Plot stellen die Platzierung der Samples in der zweidimensionalen Projektion dar. Farben repräsentieren die Sampling-Lokalität und Formen die Position im Gradienten (K,M,T).	19
Abbildung 21. Graphische Repräsentation der Muster von OTU richness und Diversität im Pilzdatensatz für die drei Positionen des topologischen Gradienten (K,M,T). Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquartilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.	20
Abbildung 22. Graphische Repräsentation der Muster von OTU richness und Diversität im Pilzdatensatz für die drei Positionen des topologischen Gradienten (K,M,T), separiert für die Lokalitäten. Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquartilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.	21
Abbildung 23. Pilzlicher ITS-Datensatz. Abweichungen als Vielfaches der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion der Umweltgradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind dabei durch ihre Zuordnung zu Gattungen zusammengefasst. Nur solche Gattungen mit Varianz größer 10^5 werden einbezogen, bzw. solche mit signifikanter Abweichung ($p>0.01$). Farbkodes entsprechen den Zuordnungen zu Pilzordnungen.	24
Abbildung 24. Pilzlicher ITS-Datensatz. Abweichungen als Vielfaches der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion der Umweltgradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind dabei durch ihre Zuordnung zu Gattungen zusammengefasst. Nur solche Ordnungen mit Varianz größer 10^4 werden einbezogen, bzw. solche mit signifikanter Abweichung ($p>0.05$). Farbkodes entsprechen den Zuordnungen zu Pilzklassen.	25
Abbildung 25. Pilzlicher ITS-Datensatz. Abweichungen als Vielfaches der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion der Umweltgradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind dabei durch ihre Zuordnung zu Gattungen zusammengefasst. Nur solche Gattungen mit Varianz größer 10^4 werden einbezogen, bzw. solche mit signifikanter Abweichung ($p>0.01$). Farbkodes entsprechen den Zuordnungen zu Pilzklassen.	25
Abbildung 26. Bakteriendatensatz (Basierend auf der Sequenzierung der variablen Regionen V3 und V4 des 16S ribosomalen RNA Gens). Links, die Zahl der gemeinsamen und exklusiven OTUs zwischen Lokalitäten, und rechts, zwischen den Teilen des ökologischen Gradienten.	26
Abbildung 27. Taxonomische Zusammensetzung der Bakterien auf Phylumebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen.	28
Abbildung 28. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten auf Phylumebene. Die Säulenhöhen zeigen den Anteil eines jeden Samples zu den sequenzierten Phyla.	28
Abbildung 29. Taxonomische Zusammensetzung der Bakterien auf Klassenebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen.	29
Abbildung 30. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten auf Klassenebene. Die Säulenhöhen zeigen den Anteil eines jeden Samples zu den sequenzierten Klassen. Bakterien die nicht zuordenbar waren, wurden nicht berücksichtigt.	29
Abbildung 31. Taxonomische Zusammensetzung der Bakterien auf Ordnungsebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, wurden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.	30
Abbildung 32. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten auf Ordnungsebene. Die Säulenhöhen zeigen den Anteil eines jeden Samples zu den sequenzierten Ordnungen. Bakterien die nicht zuordenbar waren wurden nicht berücksichtigt.	30

Abbildung 33. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten-Datensatzes auf Familien-Ebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.	31
Abbildung 34. Taxonomische Zusammensetzung der Prokaryoten-Datensatzes auf Genus-Ebene. Nur die 40 häufigsten Taxa sind hier gezeigt. Säulenhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl von abgelesenen Sequenzen. Da die Zahl der nicht zugeordneten reads linear mit niederen taxonomischen Niveaus zunimmt, werden sie zugunsten der Darstellungsklarheit weggelassen.	31
Abbildung 35. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Ergebnisse aus der MDS Ordination auf den ersten beiden Achsen, basierend auf Unifrac Distanzen. Die Punkte in den Plots reflektieren die Platzierung der individuellen Samples nach ihrer Ähnlichkeit. Farben entsprechen der taxonomischen Zuordnung auf Phylumebene.	32
Abbildung 36. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Ergebnisse aus der MDS Ordination auf den ersten beiden Achsen, basierend auf Unifrac Distanzen. Die Punkte in den Plots reflektieren die Platzierung der individuellen Samples nach ihrer Ähnlichkeit. Farben entsprechen der taxonomischen Zuordnung auf Klassenebene.	33
Abbildung 37. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Resultate der MDS Ordination auf den ersten beiden Ordinationsachsen, basierend auf Unifrac Distanzen. Die Punkte in den Plots reflektieren die Platzierung der individuellen Samples nach ihrer Ähnlichkeit. Farben stehen für Lokalität und Formen für Position im Gradient	34
Abbildung 38. Graphische Repräsentation der Ergebnisse der MDS Ordination des Bakteriendatensatz, anhand der ersten beiden Ordinierungsachsen und basierend auf Unifrac Distanzen. Links, die Abbildung unterteilt nach den Lokalitäten, rechts nach ihrer Position im ökologischen Gradienten. Die Punkte platzieren die Samples entsprechend ihrer Ähnlichkeit in einer zweidimensionalen Präsentation. Farben stehen für Lokalität und Formen für Position im Gradient (K,M,T).	34
Abbildung 39. Prokaryotendatensatz. Graphische Darstellung der Muster von OTU richness und Diversität für die drei Positionen im ökologischen Gradienten (K,M,T). Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquantilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.	35
Abbildung 40. Prokaryoten-Datensatz. Graphische Repräsentation der Muster von OTU Reichhaltigkeit und Diversität in den drei Positionen des Gradienten (K,M,T), jeweils separiert nach Lokalität. Der horizontale Strich in den Boxen steht für den Medianwert, die Box selbst entspricht dem Interquantilbereich (IQR) zwischen erster und dritter Quartile (25%,75% der beobachteten Werte). Die Ausdehnung der vertikalen Endstriche (whiskers) schließt Werte größer als das 1,5-fache der IQR aus. Punktfarben entsprechen den Lokalitäten.	36
Abbildung 41. Datensatz der Prokaryoten. Abweichungen in der Sequenzhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion des Gradienten (K vs. T) auf OTU Niveau. OTUs sind mit ihrer Zuordnung zu Ordnungen dargestellt. Nur jene OTUs mit einer Varianz größer als 10^4 wurden einbezogen, sowie nur hochsignifikante Vergleiche ($p < 0.001$).	40
Abbildung 42. Datensatz der Prokaryoten. Abweichungen in der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion des Gradienten (K vs. T) mit OTUs, die zu Ordnungen aggregiert sind. Nur jene OTUs mit einer Varianz größer als 10^{-6} wurden einbezogen, sowie nur hochsignifikante Vergleiche ($p < 0.001$).	40
Abbildung 43. Datensatz der Prokaryoten Abweichungen in der Sequenzierhäufigkeit zwischen oberer und unterer Fraktion des Gradienten (K vs. T) mit OTUs, die zu Gattungen aggregiert sind. Nur jene OTUs mit einer Varianz größer als 10^{-7} wurden einbezogen, sowie nur hochsignifikante Vergleiche ($p < 0.001$).	41

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abarenkov, Kessy, R Henrik Nilsson, Karl-Henrik Larsson, Ian J Alexander, Ursula Eberhardt, Susanne Erland, Klaus Høiland, et al. 2010. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi--Recent Updates and Future Perspectives." *The New Phytologist* 186 (2): 281–85. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x>.
- Anders, S; Huber, W. 2010. "Differential Expression Analysis for Sequence Count Data" *Genome Biology* 11(10): R106
- Andrews S. (2010). "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data". Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bates, Douglas, Martin Mächler, Ben Bolker, and Steve Walker. 2015. "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." *Journal of Statistical Software* 67 (1): 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Bengtsson-Palme, Johan, Vilmar Veldre, Martin Ryberg, Martin Hartmann, Sara Branco, Zheng Wang, Anna Godhe, et al. 2013. "ITSx: Improved Software Detection and Extraction of ITS1 and ITS2 from Ribosomal ITS Sequences of Fungi and Other Eukaryotes for Use in Environmental Sequencing." *Methods in Ecology and Evolution* 4: 914–19.
- Bokulich, Nicholas A., Benjamin D. Kaehler, Jai Ram Rideout, Matthew Dillon, Evan Bolyen, Rob Knight, Gavin A. Huttley, and J. Gregory Caporaso. 2018. "Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifier Plugin." *Microbiome* 6 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>.
- Bolger, Anthony M., Marc Lohse, and Bjoern Usadel. 2014. "Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data." *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Cao, Yong, W Peter Williams, and Anthony W Bark. 1997. "Similarity Measure Bias in River Benthic Aufwuchs Community Analysis." *Water Environment Research* 69 (1): 95–106.
- Caporaso, J. Gregory, Justin Kuczynski, Jesse Stombaugh, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Elizabeth K. Costello, Noah Fierer, et al. 2010. "QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data." *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- Chang, Qin, Yihui Luan, and Fengzhu Sun. 2011. "Variance Adjusted Weighted UniFrac : A Powerful Beta Diversity Measure for Comparing Communities Based on Phylogeny."
- Edgar, Robert. 2016. "UCHIME2: Improved Chimera Prediction for Amplicon Sequencing." *BioRxiv*, 074252. <https://doi.org/10.1101/074252>.
- Edgar, Robert C., Brian J. Haas, Jose C. Clemente, Christopher Quince, and Rob Knight. 2011. "UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection." *Bioinformatics* 27 (16): 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.
- Ewels, Philip, Måns Magnusson, Sverker Lundin, and Max Käller. 2016. "MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report." *Bioinformatics* 32 (19): 3047–48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>.
- Faith, D. P., P. R. Minchin, and L. Belbin. 1987. "Compositional Dissimilarity as a Robust Measure of Ecological Distance." *Vegetatio* 69: 57–68.
- Hannon-lab. 2018. "FASTX Toolkit." [Http://Hannonlab.Cshl.Edu/Fastx_toolkit/Index.Html](http://Hannonlab.Cshl.Edu/Fastx_toolkit/Index.Html). http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/.
- Huber, W., V. J. Carey, R. Gentleman, S. Anders, M. Carlson, B. S. Carvalho, H. C. Bravo, et al. 2015. "Orchestrating High-Throughput Genomic Analysis with Bioconductor." *Nature Methods* 12 (2): 115–21.
- Huson, Dh, Suparna Mitra, and Hj Ruscheweyh. 2011. "Integrative Analysis of Environmental Sequences Using MEGAN4." *Genome Research* 21 (9): 1552–60. <https://doi.org/10.1101/gr.120618.111>. Freely.
- Katoh, Kazutaka, Kazuharu Misawa, Kei-ichi Kuma, and Takashi Miyata. 2002. "MAFFT: A Novel Method for Rapid Multiple Sequence Alignment Based on Fast Fourier Transform." *Nucleic Acids Research* 30 (14): 3059–66. <https://doi.org/10.1093/nar/gk436>.
- Katoh, Standley. 2013. "MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability." *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–80.
- Körner, Christian. 2019. "Langzeitmonitoring Terrestrischer Alpiner Ökosysteme Im Nationalpark Hohe Tauern - Konzept und Rahmenbedingungen." *Wissenswert, Methoden – Handbuch.*
- Kruskal, J.B. 1964a. "Multidimensional Scaling by Optimizing Goodness-of-Fit to a Nonmetric Hypothesis." *Psychometrika* 29: 1–28.
- Kruskal, J.B. 1964b. "Nonmetric Multidimensional Scaling: A Numerical Method." *Psychometrika* 29: 115–29.
- Legendre, Pierre, and Louis Legendre. 2012. *Numerical Ecology*. 3rd Edition. Elsevier.
- Lozupone, Catherine, and Rob Knight. 2005. "UniFrac : A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities" 71 (12): 8228–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228>.
- Lozupone, Catherine, Manuel E Lladser, Dan Knights, Jesse Stombaugh, and Rob Knight. 2010. "UniFrac : An Effective Distance Metric for Microbial Community Comparison." *The ISME Journal* 5 (2): 169–72. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.
- Magoč, Tanja, and Steven L. Salzberg. 2011. "FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies." *Bioinformatics* 27 (21): 2957–63. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>.
- Mahé, Frédéric, Torbjørn Rognes, Christopher Quince, Colomban de Vargas, and Micah Dunthorn. 2014. "Swarm: Robust and Fast Clustering Method for Amplicon-Based Studies." *PeerJ* 2: e593. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.7717/peerj.593>.
- Martin, Marcel. 2011. "Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads." *EMBNET.Journal* 17 (1): 10–12.

- <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- McCarthy, Davis J., Yunshun Chen, and Gordon K. Smyth. 2012. "Differential Expression Analysis of Multifactor RNA-Seq Experiments with Respect to Biological Variation." *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4288–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gks042>.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2014. "Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible." *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>.
- Minchin, Peter R. 1987. "An Evaluation of the Relative Robustness of Techniques for Ecological Ordination." *Vegetatio* 69 (1–3): 89–107. <https://doi.org/10.1007/BF00038690>.
- Newesely, Christian, Ulrike Tappeiner, and Christian Körner. 2019. "Langzeitmonitoring Terrestrischer Alpiner Ökosysteme Im Nationalpark Hohe Tauern - Methodenhandbuch. Modul 01: Standortklima, Bodenphysik, Bodenchemie und Pflanzliche Produktivität. Wissenswert, Methoden." Endbericht. Unveröffentlichter Bericht im Auftrag des Nationalparks Hohe Tauern.
- Nilsson, Rolf Henrik, Karl-Henrik Larsson, Andy F S Taylor, Johan Bengtsson-Palme, Thomas S Jeppesen, Dmitry Schigel, Peter Kennedy, Kathryn Picard, Frank Oliver Glöckner, Leho Tedersoo, Irja Saar, Urmas Kõljalg and Kessy Abarenkov. 2019. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications." *Nucleic Acids Research* 47 (D1): D259–64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>.
- Nilsson, Rolf Henrik, AF S Taylor, Scott T Bates, D Thomas, Johan Bengtsson-palme, Tony M Callaghan, Brian Douglas, Tiia Drenkhan, Ursula Eberhardt, Margarita Dueñas, Tine Grebenc, Gareth W. Griffith, Martin Hartmann, Paul M. Kirk, Petr Kohout, Ellen Larsson, Björn D. Lindahl, Robert Lücking, María P. Martín, P. Brandon Matheny, Nhu H. Nguyen, Tuula Niskanen, Jane Oja, Kabir G. Peay, Ursula Peintner, Marko Peterson, Kadri Põldmaa, Lauri Saag, Irja Saar, Arthur Schüßler, James A. Scott, Carolina Senés, Matthew E. Smith, Ave Suija, D. Lee Taylor, M. Teresa Telleria, Michael Weiss, Karl-Henrik Larsson. 2013. "Towards a Unified Paradigm for Sequence-Based Identification of Fungi," 5271–77.
- Oksanen, Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs, Helene Wagner. 2019. "Package, Vegan: Community Ecology." <https://cran.r-project.org/package=vegan>.
- Paradis, Emmanuel, Julien Claude, and Korbinian Strimmer. 2004. "APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R Language." *Bioinformatics* 20 (2): 289–90. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>.
- Price, Morgan N., Paramvir S. Dehal, and Adam P. Arkin. 2010. "FastTree 2 - Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>.
- Pruesse, Elmar, Christian Quast, Katrin Knittel, Bernhard M Fuchs, Frank Oliver Glo, and Wolfgang Ludwig. 2007. "SILVA : A Comprehensive Online Resource for Quality Checked and Aligned Ribosomal RNA Sequence Data Compatible with ARB" 35 (21): 7188–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>.
- Quast, Christian, Anna Klindworth, Elmar Pruesse, Timmy Schweer, Matthias Horn, and Frank Oliver Glo. 2013. "Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies" 41 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Frank Oliver Glo, and Pablo Yarza. 2013. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project : Improved Data Processing and Web-Based Tools" 41 (November 2012): 590–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing. 2018. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." Vienna, Austria.
- Robinson, Mark D, Davis J Mccarthy, and Gordon K Smyth. 2010. "EdgeR": A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data" 26 (1): 139–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Rognes, Torbjørn, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, and Frédéric Mahé. 2016. "VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics." *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
- White, T.J., Thomas D. Bruns, S. Lee, and J.W. John W. Taylor. 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics." In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, edited by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, 315–322. San Diego: Academic Press Inc.
- Zhang, Zheng, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller. 2000. "A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences." *Journal of Computational Biology* 7: 203–14.



Medieninhaber und Herausgeber, Verleger:

Nationalparkrat Hohe Tauern

Kirchplatz 2, 9971 Matri

Tel.: +43 (0) 4875 / 5112 | E-Mail: nationalparkrat@hohetauern.at



www.hohetauern.at