

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Petra Zedníková

Růst vikvovitých rostlin během primární sukcese na výsypkách po těžbě uhlí

The growth of leguminous plants during primary succession in post-mining sites

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. Mgr. Ing. Jan Frouz, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechnu použitou literaturu a informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného akademického titulu. Předložená tištěná verze je totožná s elektronickou verzí.

V Praze dne

.....

Podpis

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Prof. Mgr. Ing. Janu Frouzovi, CSc. za jeho čas, který mi věnoval během tvorby mé práce, trpělivost a cenné rady a podněty. Dále děkuji Mgr. Jaroslavu Kuklovi za pomoc při odběru půd a Mgr. Josefu Šonkovi za pomoc při práci ve skleníku. Děkuji také Ing. Haně Šimáčkové, Mgr. Elišce Ječmenové, Jitce Hubáčové a RNDr. Olze Vinduškové, Ph.D. za rady a pomoc při zpracování vzorků v laboratoři. Na závěr patří velké poděkování mé rodině za dlouhodobou podporu při studiu.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Abstrakt | 7 |
| Abstract..... | 8 |
| 1. Úvod | 9 |
| 1.1 Cíle | 11 |
| 1.2 Hypotézy..... | 11 |
| 2. Literární přehled..... | 12 |
| 2.1 Symbiotická fixace dusíku u vikvovitých rostlin | 12 |
| 2.1.1 Minerální dusík v půdě a mechanismus zpětné vazby dusíku | 13 |
| 2.1.2 Faktory ovlivňující symbiotickou fixaci dusíku vikvovitých rostlin..... | 14 |
| 2.2 Význam symbiotické fixace dusíku vikvovitých rostlin pro ekosystémy | 21 |
| 2.2.1 Symbiotická fixace dusíku v primární sukcesi | 21 |
| 2.2.2. Facilitace vikvovitými rostlinami..... | 22 |
| 2.3 Vztah vikvovitých rostlin k růstu okolní vegetace | 25 |
| 2.3.1 Přenos dusíku do okolních rostlin..... | 25 |
| 2.3.2 Dynamika interakcí vikvovitých rostlin a trav | 26 |
| 2.3.3 Root foraging..... | 27 |
| 3. Materiál a metody | 29 |
| 3.1 Odběr vzorků, příprava a průběh experimentu | 29 |
| 3.2 Metodika měření..... | 31 |
| 3.2.1 Stanovení nadzemní biomasy rostlin | 31 |
| 3.2.2 Stanovení podzemní biomasy rostlin..... | 31 |
| 3.2.3 Stanovení vlhkosti půdy | 31 |
| 3.2.4 Stanovení bazální respirace půdy titrační metodou | 32 |
| 3.2.5 Stanovení pH v půdě | 33 |
| 3.2.6 Stanovení dostupného fosforu v půdě spektrofotometricky | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.7 Stanovení dostupného železa v půdě | 34 |
| 3.2.8 Stanovení uhlíku mikrobiální biomasy fumigačně extrakční metodou (TOC), celkového dusíku (TN) a poměru C:N | 34 |
| 3.3 Statistické zpracování dat..... | 36 |
| 4. Výsledky..... | 37 |
| 4.1 Růst vikvovitých rostlin a trávy <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice | 37 |
| 4.2 Růst kořenů vikvovitých rostlin a trávy <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice..... | 41 |
| 4.3 Vlhkost půdy s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice | 43 |
| 4.4 Respirace půdy s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice | 45 |
| 4.5 pH půdy s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice | 47 |
| 4.6 Dostupný fosfor v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice..... | 49 |
| 4.7 Dostupné železo v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice..... | 51 |
| 4.8 Celkový organický uhlík (TOC) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice | 53 |
| 4.9 Celkový dusík (TN) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice..... | 56 |
| 4.10 Poměr obsahu uhlíku a dusíku (C:N) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou <i>Poa compressa</i> v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice..... | 58 |
| 5. Diskuze..... | 61 |
| 5.1 Růst vikvovitých rostlin bez konkurence trávy během sukcese..... | 61 |
| 5.2 Růst vikvovitých rostlin s konkurencí trávy během sukcese | 62 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.3 | Vliv vikvovitých rostlin na růst trávy během sukcese | 63 |
| 5.4 | Rozdíly růstu vikvovitých rostlin na rekultivovaných plochách a plochách vyvíjejících se spontánní sukcesí..... | 65 |
| 5.5 | Vliv růstu vikvovitých rostlin na vlastnosti půdy | 66 |
| 6. | Závěr | 70 |
| 7. | Použitá literatura..... | 72 |

Abstrakt

Výsypky po těžbě uhlí se vyznačují nepříznivými podmínkami omezující rychlý rozvoj přirozené vegetace, kterým je zejména velmi nízké množství dusíku v půdě. Rostliny se schopností symbiotické fixace dusíku se mohou uplatnit při obnově těchto degradovaných území, protože zvýší obsah dusíku v půdě a urychlí primární sukcesi na výsypce.

Cílem této práce bylo vyhodnotit růst tří druhů rostlin z čeledi *Fabaceae*, a to jetele lučního (*Trifolium pratense*), štírovníku růžkatého (*Lotus corniculatus*) a vikve ptačí (*Vicia cracca*), v různě starých půdách z výsypek, které byly rekultivovány, a porovnat je s růstem v půdách z ploch, které se vyvíjely spontánní sukcesí. Dále porovnat změny v růstu těchto druhů rostlin v situaci, kdy v půdě rostly samostatně oproti růstu v konkurenci s travou lipnicí smáčkutou (*Poa compressa*). Dalším cílem bylo na základě měření různých parametrů v půdě vyhodnotit vliv růstu těchto rostlin na půdní vlastnosti v průběhu primární sukcese.

Do prosátých půd odebraných na Velké podkrušnohorské výsypce po těžbě hnědého uhlí u Sokolova byly nasety zmíněné druhy rostlin. Růst probíhal ve skleníku po dobu 5 měsíců. Následně byla stanovena nadzemní a podzemní biomasa rostlin, vlhkost půdy, respirace půdy, pH půdy, dostupný fosfor a železo, celkový uhlík, celkový dusík a C:N poměr v půdě.

Výsledky ukázaly rozdílnou úspěšnost růstu rostlin ve výsypkovém substrátu, nejlépe se dařilo jeteli, zatímco vikev rostla velmi omezeně. Růst všech sledovaných druhů se zvyšoval se sukcesním stářím ploch a rostliny rostly rychleji v půdách z ploch po rekultivaci než v půdách z ploch vyvíjejících se spontánní sukcesí, ale s rostoucím stářím ploch se rozdíly zmenšovaly. Růst trávy v konkurenci s vikvovitými rostlinami se s rostoucím stářím ploch také zvyšoval. Sledované druhy vikvovitých rostlin s konkurencí trávy rostly méně než bez konkurence s výjimkou nejmladších ploch (stáří 15 let), kde byl růst srovnatelný. Nízký růst vikve dovolil trávě ji přerůst.

Růst sledovaných druhů vikvovitých rostlin zvýšil množství dusíku v půdě. Další půdní vlastnosti ovlivnil nejvíce růst jetele, který urychlil akumulaci organického uhlíku, zlepšil půdní vlhkost a ovlivnil množství dostupného fosforu, železa a pH půdy.

Klíčová slova: symbiotická fixace dusíku, vikvovité rostliny, primární sukcese, výsypky, obnova

Abstract

Post-mining sites are characterized by unfavorable conditions limiting the rapid development of natural vegetation, which is particularly low nitrogen in the soil. Plants with symbiotic nitrogen fixation can be used for reclamation these degraded areas because they increase the nitrogen content in soil and accelerate the primary succession on the dump.

The aim of this study was to evaluate the growth of three species of plants of the family Fabaceae, namely red clover (*Trifolium pratense*), bird's foot trefoil (*Lotus corniculatus*) and bird wetch (*Vicia cracca*), in differently old soils from dumps that were reclaimed and compare them to the growth in soils from areas that developed by spontaneous succession. Furthermore, to compare the changes in the growth of these species of plants in a situation where they grew separately in the soil compared to the growth in competition with grass (*Poa compressa*). Another aim was to evaluate the influence of the growth of these plants on soil properties during primary succession on the basis of measurement of various parameters in soil.

The mentioned species of plants were sown into the sifted soils taken from the Velká podkrušnohorská výsypka after brown coal mining near Sokolov. The growth took place in a greenhouse for 5 months. Subsequently, above-ground and underground plant biomass, dry soil weight, soil respiration, soil pH, available phosphorus and iron, total carbon, total nitrogen and C:N ratio in soil were determined.

The results showed a different success of the plant growth in the soils, the best was red clover, while bird wetch grew very limited. The growth of all species studied increased with succession age and the plants grew faster in soils from reclaimed sites than in soil from unreclaimed sites, but with increasing age the differences decreased. The growth of the grass in competition with leguminous plants has also increased with increasing site age. The observed species of leguminous plants with competition of grass grew less than without competition, with the exception of the youngest site (15 years old) where the growth was comparable. The low growth of bird wetch was overgrown by grass.

The growth of the observed species of leguminous plants increased the amount of nitrogen in the soil. Further soil properties affected most red clover, which accelerated the accumulation of organic carbon, improved soil moisture and affected the amount of available phosphorus, iron and soil pH.

Keywords: symbiotic nitrogen fixation, leguminous plants, primary succession, post-mining sites, reclamation

1. Úvod

Povrchová těžba surovin je spojena s degradací území, což značným způsobem ovlivňuje ekosystémové funkce a také celkový ráz krajiny. Odvezením hlušiny vznikají rozsáhlé výsyvky, které po ukončení těžby musí být rekultivovány, u nás podle zákona č. 334/1992 Sb. o ochraně zemědělského půdního fondu. Vše ale naznačuje, že obnova substrátu a vegetace na výsypkách může být ponechána přírodním procesům, a že řada problémů bránících uspokojivému růstu rostlin a obnově je dlouhodobě řešitelná ekologickými procesy při spontánní sukcesi (Bradshaw, 1997). Substrát výsypek obvykle neomezuje růst všech rostlin, a některé druhy rostlin jsou schopny jej kolonizovat i velmi brzy po jejich navrstvení (Prach et al., 2001; Frouz et al., 2008). Procesy přirozené sukcese jsou ale ve většině případů pomalé, a vývoj vyhovujícího vegetačního povrchu trvá 50 ale i 100 let (Bradshaw, 1997), v řadě případů je však mnohem rychlejší (Prach et al., 2001; Frouz et al., 2008).

Výsypkové substráty se vyznačují nepříznivými podmínkami omezující rychlý rozvoj přirozené vegetace. K nim patří často nevhodná půdní struktura, ale zásadním problémem je nedostatek tří hlavních živin, a to dusíku, fosforu a draslíku (Sheoran et al., 2008). Jejich hlavním zdrojem je organická hmota, která na výsypkách, kvůli převrstvování půd hlušinou při jejich vzniku, chybí.

Běžnou praktikou a řešením těchto problémů při rekultivacích je počáteční rozprostření úrodné vrstvy půdy - top soil, která zajistí vyhovující substrát pro vývoj vegetace. Obvykle se ale jedná o finančně velmi drahé opatření a v rozsáhlých degradovaných územích může být vhodná půda nedostupná (Bradshaw, 1997).

Hlavním limitujícím faktorem na výsypkách je velmi nízké množství dusíku (Bradshaw, 1997). Dusík je základním stavebním prvkem pro růst a vývoj rostlin. V přírodních ekosystémech se do půdy dostává z převážné většiny procesem biologické fixace, kdy je prokaryotickými organismy, diazotrofy, atmosférický dusík (N_2) redukován na amoniak (NH_3) a stává se dostupným pro kořeny rostlin. Ve většině přírodních terestrických ekosystémů je dusík hlavní živinou, jejíž nízká dostupnost v půdě omezuje růst rostlin (Vitousek a Farrington, 1997). Jako strategie pro získání dusíku při jeho nízkém množství v půdě se mezi rostlinami a mikroorganismy fixující dusík vyvinuly symbiotické vztahy. Hlavní skupinou rostlin s touto symbiózou je čeleď Fabaceae, tedy vikvovité či bobovité rostliny (Freiberg et al., 1997).

Při obnově výsypek, ať už pomocí rekultivace nebo s využitím spontánní sukcese, se proto diskutuje o využití procesu fixace dusíku při vysazení rostlin fixující vzdušný dusík. Tyto rostliny

mohou přímo obohatit půdu dodáním dusíku prostřednictvím svých kořenů a hlízek, čímž významně zlepší úrodnost půdy (Zhang et al., 2001). Dále přispějí skrze produkci snadno rozložitelného rostlinného opadu, který je na obsah dusíku bohatší, než jiné druhy rostlin. Tímto způsobem mohou rostliny fixující vzdušný dusík zlepšit podmínky prostředí pro ostatní rostliny a urychlit následný vývoj půdy a vegetace na výsypce.

Ke zlepšení substrátu a rychlejšímu vývoji půd kromě vlastnímu dodání dusíku přispívají kořeny těchto rostlin, které zlepšují půdní strukturu a infiltraci vody, vlastní rostliny chrání půdu před erozí a zlepšují hromadění jemných částic. Produkce organické hmoty bohaté na dusík zlepšuje obrát živin a kvalitu půdy (Bradshaw, 1997; Tordoff et al., 2000). Vikvovité rostliny jsou v drsných prostředí nezbytné pro další rozvoj vegetace, a mají vliv na rozmanitost a dynamiku společenstev (Callaway, 1995).

Proces symbiotické fixace dusíku vikvovitých rostlin však může být omezen řadou faktorů, zejména dostupností dalších živin, které mohou vést ke snížení růstu samotných rostlin. Dále může být jejich růst omezen interakcemi s ostatními rostlinami, především konkurencí s trávami. Z toho důvodu je nutné mechanismy a úspěšnost růstu vikvovitých rostlin ve výsypkových půdách studovat, k čemuž má přispět tato diplomová práce.

1.1 Cíle

Cílem mé diplomové práce je sledovat a vyhodnotit růst tří vybraných druhů vikvovitých rostlin (*Trifolium pratense*, *Vicia cracca*, *Lotus corniculatus*) v různě starých půdách z výsypek, které byly rekultivovány, a porovnat je s růstem v půdách, které se vyvíjely spontánní sukcesí. Dále porovnat změny v růstu vikvovitých rostlin v situaci, kdy v půdě rostly samostatně oproti tomu, kdy rostly v konkurenci s travou (*Poa compressa*). Dalším cílem je na základě měření různých parametrů v půdě vyhodnotit vliv růstu těchto rostlin na půdní vlastnosti v průběhu sukcese.

1.2 Hypotézy

- (1) S rostoucím stářím půd poroste množství dusíku v půdě.
- (2) Růst vikvovitých rostlin bez konkurence trávy bude v průběhu sukcese pozvolně růst.
- (3) Během sukcese poroste vliv konkurence trávy.
- (4) Růst vikvovitých rostlin s konkurencí trávy bude od určitého stáří půdy klesat.
- (5) Růst vikvovitých rostlin bude rychlejší v rekultivovaných půdách oproti půdám, kde probíhala spontánní sukcese; s rostoucím stářím půd se tyto rozdíly budou zmenšovat.

2. Literární přehled

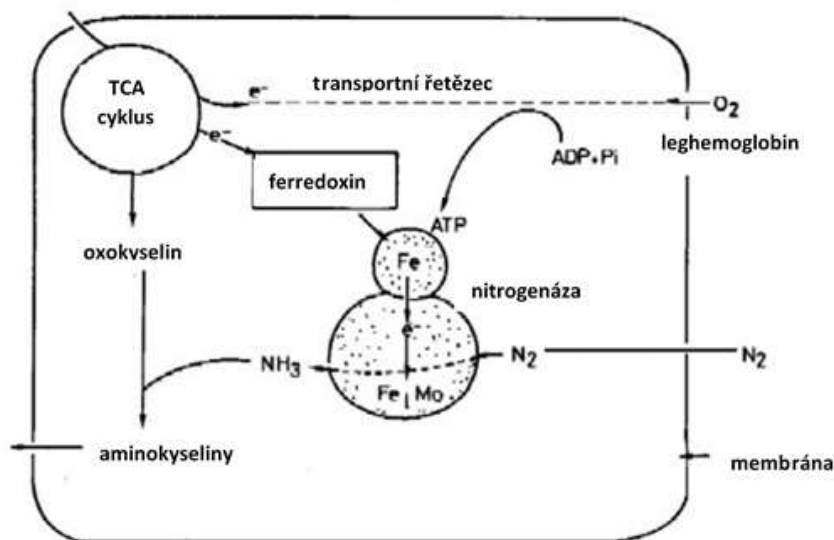
2.1 Symbiotická fixace dusíku u vřkvoitých rostlin

Schopnost symbiotické fixace dusíku s rostlinami čeledi Fabaceae má asi 90 % druhů této skupiny (Möllerová, 2006). Bakterie vstupující do tohoto symbiotického vztahu, rhizobia, pochází z rodů *Rhizobium* a *Bradyrhizobium*. Jsou to volně žijící půdní gramnegativní bakterie, které za normálních okolností dusík nefixují a jsou schopné jeho fixace pouze v hlízkách hostitelské rostliny. Rozbití trojně vazby v molekule vzdušného dusíku při redukci na amonný dusík vyžaduje poměrně velké množství energie, které rhizobia získávají v symbióze od svých hostitelských rostlin ve formě sacharidů pocházející z fotosyntézy (Wagner, 2011). Konkrétně k redukci každého molu dusíku potřebují rhizobia 16 molů ATP (Hubbell a Kidder, 2009) resp. na 1 gram symbioticky fixovaného dusíku je potřeba 12 – 17 g sacharidů (Buchanan et al., 2015).

Symbiotický vztah začíná tím, že rostliny vylučují do rhizosféry kořenové exudáty obsahující fenolické látky, které slouží jako chemické signály pro chemotaxi rhizobií a ve vyšších koncentracích spouští expresi specifických plazmidových genů pro tvorbu Nod faktorů (Catoira et al., 2000) a cytokininů (Möllerová, 2006). V reakci na ně se zakrucují kořenové vlásky rostlin, tvoří se infekční vlákno a rhizobia pronikají do buněk primární kůry kořenů. Cytokiny podporují dělení buněk a vznik kořenové hlízky. V procesu nodulace, tvorby hlízek, se uvnitř hlízek rhizobia množí, ztrácí buněčné stěny a vytváří bakteroidy, velké nepravidelné větvičí se buňky obalené přeměněnou membránou původem z rostlinné buňky, které jsou pak zcela závislé na hostitelské buňce. Bakteroidy přijímají od rostliny živiny a energetické látky ve formě sacharidů a aminokyselin. Ve vzniklých hlízkách probíhá vlastní redukce vzdušného dusíku na amonný dusík. Protože je amoniak už při velmi nízkých koncentracích silným buněčným jedem, v rostlině se proto velmi rychle převádí na aminokyseliny, které mohou být využity pro syntézu bílkovin v hlízkách a jejich převážná část je transportována xylémem do nadzemních částí rostliny, kde je začleněna do metabolismu dusíku a slouží pro růst rostlin (Wagner, 2011).

Vlastní fixaci dusíku umožňuje enzymový komplex nitrogenáza-nitrátreduktáza, zkráceně nitrogenáza, který se syntetizuje v hlízkách. Fixace dusíku začíná redukcí nitrogenázy a pomocí nitrátreduktázy se redukuje dusík na amoniak, Nitrogenáza se skládá ze dvou bílkovinných komplexů – Fe-Mo , tedy železa a molybdenu. Enzymový komplex nitrogenázy je velmi citlivý na přítomnost kyslíku. Proto vřkvoitá rostlina produkuje bílkovinu leghemoglobin, který obsahuje hemovou skupinu se strukturou železa vázající kyslík. Transportuje tak přiměřené množství kyslíku pro buněčnou respiraci a zároveň snižuje koncentrace přebytečného atmosférického

kyslíku v hlízce, které by inaktivovaly nitrogenázu a tím celý proces fixace dusíku (Obr. 1). Leghemoglobin dodává hlízkám charakteristickou červenou barvu a obsahují ho jen plně funkční kořenové hlízky (Buchanan et al., 2015).



Obr. 1: Schéma symbiotické fixace vzdušného dusíku N₂ (podle Mengela a Kirkbyho, 1978)

2.1.1 Minerální dusík v půdě a mechanismus zpětné vazby dusíku

Symbiotická fixace dusíku je řízena mechanismem zpětné vazby dusíku v závislosti na přísunu dusíku z různých zdrojů. Pokud je dostatečně dostupný minerální dusík v půdě v dusičnanové nebo amonné formě, mají vřikvovité rostliny vnitřní mechanismy, kterými potlačují tvorbu a funkci hlízek, a upřednostňují příjem dusíku z půdy (Buchanan et al., 2015). Dusičnanový dusík v půdě je proto známý jako silný inhibitor nodulace a jeho vysoké koncentrace snižují celkově symbiotickou fixaci dusíku. Na to vřikvovité rostliny reagují zvýšeným příjmem dusíku z půdy, a proto jsou hlízky inhibovány vysokou koncentrací dusičnanů silněji, než je zpomalen růst vřikvovitých rostlin (Hellsten a Huss-Danell, 2000; Valentine et al., 2017). Některé druhy vřikvovitých rostlin mají slabou zpětnou vazbu na reaktivní dusík v půdě, jak se ukázalo u invazního janovce metlatého (*Cytisus scoparius*) (Drake, 2011). Existuje ale i několik studií o pozitivních účincích nízkých koncentrací dusičnanů na fixaci N₂ u druhů vřikvovitých, jako je sója (Gremaud a Harper 1989; Gulden a Vessey, 1997). Zvláště na počátku svého růstu potřebují vřikvovité rostliny malé množství kombinovaného dusíku, tedy i dusíku z půdy (Sprent a Sprent, 1990).

2.1.2 Faktory ovlivňující symbiotickou fixaci dusíku vikvovitých rostlin

Účinky různých environmentálních faktorů na růst a symbiotickou fixaci u vikvovitých rostlin byly široce studovány, zejména v 80. a 90. letech na zemědělských plodinách, luštěninách nebo pícech. Sledovanými rostlinami byly nejčastěji sója luštinatá (*Glycine max*), hrách setý (*Pisum sativum*), podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*), fazol obecný *Phaseolus vulgaris*), cizrna beraní (*Cicer arietinum*), vigna (*Vigna sp.*); tolice vojtěška (*Medicago sativa*), jetel podzemní (*Trifolium subterraneum*), jetel plazivý (*Trifolium repens*). Studie se zaměřovaly zejména na možná omezení výnosů rostlin.

Symbiotická fixace dusíku je celkově velmi citlivá na podmínky prostředí. Mezi ně patří zejména dostupnost živin, dostupnost vody, množství minerálního dusíku v půdě, toxické půdní faktory jako je salinita a pH, vysoká teplota, půdní kompakce (Jayasundara et al., 1988; Sprent et al., 1988; O'Hara, 2001). Jeden stresový faktor se může projevat různými účinky, např. salinita půdy může působit jako vodní stres, který ovlivňuje rychlost fotosyntézy, nebo může mít vliv na metabolismus hlízek (Keyser et al., 1993).

Nepříznivé podmínky v půdě mohou ovlivňovat různé fáze procesu fixace dusíku: přežití a růst rhizobií v půdě, infekci hostitelských kořenů a vývoj hlízek, a nakonec růst samotné hostitelské rostliny ať už přímo nebo nepřímo přes symbiotickou fixaci (O'hara et al., 1988; Caetano-Anolles et al., 1989; Graham, 1992). Míra citlivosti k nepříznivým podmínkám prostředí se mezi druhy vikvovitých rostlin liší a stejně tak jsou různě tolerantní jednotlivé druhy rhizobií (Graham et al., 1982; Osa-Afina a Alexander, 1982; Fuhrman et al., 1986; Busse a Bottomley 1989; Zahran, 1991; Keyser et al., 1993).

Proces symbiotické fixace dusíku je úzce spojený s fyziologickým stavem hostitelské vikvovité rostliny. Mnohé nepříznivé faktory prostředí, které mohou omezit rychlost fixace dusíku, a nepřímo tak ovlivnit růst vikvovitých rostlin, se zároveň v určité míře mohou projevit i přímo. Pokud bude sama hostitelská rostlina energeticky omezena (např. nedostatečnou fotosyntézou, minerální toxicitou, sníženou nebo nadměrnou vlhkostí půdy, chorobami či pastvou), nebudou rhizobia schopna projevit dostatečnou schopnost fixovat dusík (Brockwell et al., 1995; Peoples et al., 1995; Thies et al., 1995).

Dostupnost živin v půdě

Pro hladký průběh symbiotické fixace vıkvovitých rostlin je potřeba dostatečné zásobení základními živinami, které jsou nutné jak pro fungování samotné vıkvovité rostliny tak pro fungování symbiotického vztahu. Nedostatek minerálních živin nebo jejich nedostupnost jsou hlavními faktory omezující fixaci dusíku a růst vıkvovitých rostlin, ačkoli minerální výživa, růst a přežití rhizobií nejsou obvykle dostupností živin limitovány (O'Hara et al., 1988).

Pro maximální růst vıkvovitých rostlin a fixaci dusíku je přitom nepříznivější vhodná rovnováha mezi všemi živinami (Hellsten a Huss-Danell, 2000). Ze všech živin jsou pro fixaci dusíku považovány za zcela zásadní dostatečná množství zejména čtyř prvků, a to fosforu, železa, vápníku a molybdenu, což vyplývá z jejich úlohy při nodulaci a vlastní redukci amoniaku v hlízkách (O'Hara, 2001).

Fosfor

Fosfor je obecně využíván v mnoha molekulárních a biochemických rostlinných procesech, zejména v získávání, skladování a využití energie (Epstein a Bloom, 2005). V procesu fixace dusíku je fosfor důležitý jako součást ATP pro metabolismus a energetické procesy probíhající v hlízkách, které pohání redukci vzdušného dusíku na amoniakální a jeho následnou přeměnu na organický dusík (Vance et al., 2003; Rotaru a Sinclair 2008; Valentine et al., 2017).

Proces fixace dusíku je velmi energeticky náročný, protože rozbití trojné vazby v molekule atmosférického dusíku systémem nitrogenázy vyžaduje obrovské množství energie (Postgate, 1982; Dixon a Wheeler, 1986; Rotaru a Sinclair 2008). Z toho důvodu mají hlízky vysoké požadavky na zásobení fosforem, a to pro svůj vývoj, signální transdukcii, a k velkému množství P-lipidů bakterinoidů (Graham a Vance, 2000). Rostliny se symbiózou fixující vzdušný dusík tak mají celkově vyšší požadavky na dodávky fosforu než rostliny přijímající dusík pouze z půdy, a tak jsou vıkvovité rostliny velmi citlivé na jeho snížené množství v půdě (Rotaru a Sinclair 2008; Valentine et al., 2017).

Nedostatečné zásobení fosforem významně omezuje proces fixace dusíku a symbiotické interakce a snížená dostupnost fosforu v půdě tak může být jedním z nejvíce omezujících faktorů prostředí limitujících fyziologické funkce vıkvovitých rostlin (Vance et al., 2003; Valentine et al., 2017; Rotaru a Sinclair 2008). Velmi nízké hodnoty fosforu v půdě mohou vést k úplnému potlačení nodulace nebo zastavení růstu již rostoucích hlízek (Beck a Munns, 1984; Singleton et al., 1985; Leung a Bottomley, 1987; Saxena a Rewari; 1991; Almeida et al., 2000). Naopak vyšší

koncentrace fosforu v hlízkách vedly k vyšší míře fixace dusíku a vyšší akumulaci dusíku (Rotaru a Sinclair 2008).

Ukazuje se, že nízké množství dostupného fosforu má silnější účinky a zpomaluje nodulaci a fixaci dusíku silněji, než zpomaluje růst vikkvité rostliny (Drevon et Hartwig, 1997; Almeida et al., 2000). Pro maximální fungování symbiotické fixace dusíku jsou požadavky pro zásobení fosforem vyšší než pro růst vikkvité rostliny (Beck a Munns, 1984; Rotaru a Sinclair 2008), a to někdy dokonce na úkor vlastního růstu (Høgh-Jensen et al. 2002; Valentine et al., 2017). Za snížené dostupnosti se fosfor přednostně ukládá do hlízek a kořenové hlízky tak slouží jako velké zásobárny fosforu (Cassman et al., 1981; Hart, 1989; Valentine et al., 2017), a to i v případě jeho dostatečného zásobení (Drevon a Hartwig, 1977).

Vzhledem k přednostnímu zásobení fosforu do hlízek jsou v nich při velmi nízkých dávkách fosforu dokonce vyšší koncentrace fosforu než hostitelské rostlině (Drevon et Hartwig, 1977; Jakobsen, 1985; Sa a Israel, 1991), protože se zdá, že hlízky přijímají fosfor přímo z živného roztoku (Al-Niemi et al., 1998), a tak se v hlízkách udržují jeho vysoké koncentrace. Navíc hlízky vyvinuly řadu strategií, jak udržovat metabolismus dusíku a odolávat účinkům nedostatku fosforu, jako je střídání složení exportních produktů hlízek do vlastní rostliny nebo schopnost recyklovat aminokyseliny zpět na organické kyseliny (Valentine et al., 2017).

Pokud je ovšem fosfor nedostupný dlouhodobě, potom koncentrace fosforu v hlízkách klesá, ale nastává to až dlouho poté, co nedostatku fosforu podléhají kořeny vikkvité rostliny (Kleinert et al., 2014).

Několik prací (Robson et al., 1981; Jakobsen, 1985; Sa a Israel, 1991) shrnuje, že rostliny se sníženým zásobením fosforem, a to i ty plně závislé na symbiotické fixaci dusíku, nejsou limitovány sníženým množstvím fosforu, protože nedostatek fosforu sníží růst samotných vikkvových rostlin, a tudíž i potřebu dusíku pro růst rostliny.

Železo

Symbiotická fixace dusíku je přímo závislá na množství dostupného železa v půdě, a ukazuje se, že silněji než na dostupnosti fosforu (Rotaru a Sinclair 2008). Vyplývá to ze skutečnosti, že je železo součástí tří bílkovin zásadních pro proces fixace dusíku probíhající v hlízkách (Tang et al., 1990; Rotaru a Sinclair, 2008). Železo je spolu s molybdenem součástí bílkovinného komplexu enzymu nitrogenáza pohánějící redukci trojné vazby vzdušného dusíku při fixaci. Železo dále tvoří hemovou složku leghemoglobinu, který tvoří asi 30 % celkových bílkovin hlízky (Appleby, 1984). Tento protein silně váže kyslík a snižuje tak koncentrace

přebytečného atmosférického kyslíku v hlízce nutného pro snížení aerobního prostředí. Železo dále vytváří se sírou bílkoviny ferredoxinu, které slouží jako přenašeče elektronů na nitrogenázu. (Buchanan et al., 2015).

Vikvovité rostliny vyžadují pro tvorbu hlízek a s tím spojené fungování celého procesu fixace dusíku větší množství železa, než potřebují jako esenciální živinu pro svůj vlastní růst a vyšší koncentrace železa vedly ve studiích k vyšší míře fixace dusíku a větší akumulaci dusíku ve vikvovité rostlině. Proces fixace dusíku je tedy více citlivý na sníženou dostupnost železa než vlastní rostlina (Tang et al., 1990; Rotaru a Sinclair, 2008). Vzhledem k tomu jsou pro maximální růst vikvovitých rostlin závislých na symbiotické fixaci dusíku potřeba vyšší koncentrace železa než pro rostliny přijímající dusík z půdy, a vikvovité rostliny jsou proto při jeho nedostatku náchylnější než ostatní rostliny (Tang et al., 1990).

Dostupnost železa se ukazuje být nejvíce klíčová pro počáteční tvorbu hlízek. Zejména ve vápenatých a alkalických půdách dochází vzhledem k vyššímu pH a s tím spojené snížené rozpustnosti železa k jeho nižší dostupnosti (Tang et al., 1990). Nedostatek železa v půdě se projevuje sníženým obsahem leghemoglobinu v hlízkách, aktivitou nitrogenázy, menším počtem bakterií v hlízkách a tedy přímo omezuje proces fixace dusíku (O'hara et al., 1988; Tang et al., 1990; Ohwaki a Sugahara, 1993; Tang et al., 2006; Rotaru a Sinclair, 2008). Přitom se ukazuje mnohem větší negativní vliv na množství bakteroidů v hlízce než na obsah leghemoglobinu (Kaczor et al., 1994).

V případě, že v půdě není dostatečné množství minerálního dusíku a vikvovité rostliny jsou tak více závislé na symbiotické fixaci, se nedostatek železa u vikvovitých rostlin může projevit jako nedostatek dusíku a může potlačit jejich růst (Tang et al., 1990).

Vápník

Vápník u vikvovitých rostlin mimo svoji úlohu jako živina pro vývoj rostlin hraje roli už na samotném počátku procesu fixace dusíku. K nedostatečnému zásobení rostlin vápníkem dochází zejména v kyselých půdách. Nízká dostupnost vápníku negativně ovlivňuje už množení samotných rhizobií v rhizosféře, které mohou infikovat kořeny hostitelských rostlin (O'Hara et al., 1988). Při infekci kořenových vlásků rhizobii se v reakci na Nod faktory produkované rhizobii spouští v buňkách kořenových vlásků fyziologické reakce jako je i příliv vápníku (Oldroyd a Downie, 2004). Nedostatek vápníku tedy ovlivňuje také přichycení rhizobií ke kořenovým vláskům (Smit et al., 1992), a i následný vývoj hlízek (Alva et al., 1991). Nízká koncentrace vápníku

v půdě tak může výrazně ovlivnit počet a vnitřní strukturu hlízek, ale i aktivitu nitrogenázy hlízek a narušit proces fixace dusíku (Banath et al., 1966; Vassileva et al., 1997).

Molybden

Molybden je specifickým prvkem pro rostliny se schopností symbiotické fixace dusíku. Spolu se železem je součástí enzymu nitrogenáza v kofaktoru Fe-Mo, a je tak prvkem nezbytným pro proces fixace dusíku (Allen et al., 1999; Wiedenhoef, 2006). Hlízky mají proto vyšší požadavky na zásobení molybdenem než vyžaduje hostitelská vikvovitá rostlina (O'hara et al., 1988).

Při nízké dostupnosti je molybden přednostně transportován do hlízek (Brodrick a Giller, 1991). K tomu dochází zejména v kyselých půdách, kde je kvůli nízkému pH molybden málo rozpustný, např. v půdách humidních a subhumidních tropů. Zde je proto u rostlin závislých na symbiotické fixaci dusíku běžný nedostatek dusíku způsobený nedostatkem molybdenu (Dilworth a Loneragan, 1991).

Kobalt

Kobalt je součástí kofaktoru kobalaminu, koenzymu, který významně přispívá k růstu hlízek a účastní se vlastního procesu fixace dusíku (Dilworth et al., 1979; Licht et al., 1996, Jordan et Reichard, 1998). Dále hraje důležitou strukturní roli v proteinech bakterií a je tak nezbytný pro růst rhizobií a jako součást komplexu bakteriálních enzymů, a při sníženém množství kobaltu klesá obsah bakteroidů v hlízkách (Cowles et al., 1969; Dilworth et al., 1979). Kobalt je také esenciální složkou propionátového cyklu, který zřejmě řídí syntézu leghemoglobinu, a obsah leghemoglobinu tak přímo souvisí s množstvím kobaltu (Dilworth et al., 1979).

Snížená fixace dusíku byla pozorována v reakci na nízkou dostupnost dalších prvků. Např. nedostatek mědi snížil omezením fixace i růst vlastní hostitelské rostliny (Snowball et al., 1980). Vlivem nedostatku bóru na růst rostlinných buněk poklesl počet rhizobií infikujících hostitelské buňky a počet infekčních vláken, která navíc vytvářela morfologické anomálie (Bolanos et al., 1996), a při vážném deficitu dokonce omezil vývoj hlízek (O'hara et al., 1988).

Salinita, půdní vlhkost, půdní pH, teplota půdy, CO₂

Půdní pH

Různé druhy vikvovitých rostlin se velmi liší v toleranci vůči různým hodnotám pH a značná variabilita existuje mezi rhizobii (Van Rossum a al., 1994; Tang a Thomson, 1996; Correa a Barneix, 1997). Většina vikvovitých rostlin, zvláště pokud je závislá na symbiotické fixaci dusíku, ale vyžaduje pro svůj růst neutrální až mírně kyselou půdu (Brockwell et al., 1991; Bordeleau a Prevost, 1994). Hodnoty pH v půdě mají zásadní vliv na míru rozpustnosti živin, a tím jejich dostupnost pro rostliny, což může být u výše uvedených prvků nutných pro fixaci dusíku zásadní.

Kyselost půdy omezuje symbiotickou fixaci N₂ prostřednictvím snížení nodulace, což je hlavním limitujícím faktorem fixace dusíku mnoha druhů vikvovitých rostlin rostoucích v kyselých minerálních půdách (Graham et al., 1982; Buerkert et al., 1990; Pijnenberg a Lie, 1990; Brockwell et al., 1991; Ibekwe et al., 1997).

Při pH nižším než 5,0 dochází k snížení nodulace (Evans et al., 1980; Bell et al., 1989; Bordeleau a Prevost, 1994). Jednou z příčin se ukazuje neschopnost některých rhizobií přetrvávat za takových podmínek v půdě (Graham et al., 1982; Carter et al., 1994; Bayoumi et al., 1995), což ovlivní infekci a přichycení rhizobií ke kořenovým vláskům vikvovité rostliny (Vargas a Graham, 1988; Caetano-Anolles et al., 1989) a omezí proces fixace dusíku. Právě počáteční založení symbiotického vztahu se ukazuje být mnohem mnohem citlivější na nízké hodnoty pH v půdě než samotný růst bakterií nebo růst kořenů (Evans et al., 1980). Na druhou stranu se snížená nodulace může vyskytnout i tam, kde žije životaschopná populace rhizobií (Graham, 1992; Graham et al., 1994). To může souviset se zvýšenou dostupností těžkých kovů jako je hliníku, který zabraňuje nodulaci (Bell et al., 1989; Bordeleau a Prevost, 1994).

Soli a osmotický stres

Zvýšení koncentrací soli může mít škodlivé účinky vliv na půdní mikrobiální populace v důsledku přímé toxicity i osmotického stresu (Tate, 1995). Ačkoli bakterie kolonizující kořeny vikvovitých rostlin rodu *Rhizobium* a *Bradyrhizobium* jsou vůči solím více tolerantní než jejich hostitelské vikvovité rostliny, vykazují značnou variabilitu v toleranci k solím (Zahran, 1999). Stres ze zvýšeného množství solí v půdě potlačuje počáteční fáze symbiotického vztahu rhizobií s vikvovitými rostlinami, tedy infekci kořenů. Projevuje se zkroucením a deformací kořenových vlásků a sníženou infekcí rhizobii, což snižuje nodulaci a celkově vede ke snížení míry fixace dusíku (Zahran a Sprent, 1986; Delgado et al., 1994; Sprent a Zahran, 1998; Zahran, 1999).

Nedostatek půdní vlhkosti

Nedostatek půdní vlhkosti má významný vliv na fixaci dusíku, protože infekce kořenů, růst a aktivita hlízek jsou více citlivé na vodní stres než obecný metabolismus kořenů a výhonků vikkvité rostliny (Zahran a Sprent, 1986; Albrecht et al., 1994). Nedostatek půdní vlhkosti vedl u některých sledovaných vikkvových rostlin k modifikaci samotných rhizobiálních buněk, což nakonec snížilo infekci kořenů, počet infekčních vláken nebo zcela zabránilo nodulaci (Worrall a Roughley, 1976; Abdel-Wahab a Zahran, 1979; Hunt et al., 1981; Abdel-Wahab a Zahran, 1983; Simpson a Daft, 1991)

Citlivost ke stresu vlhkostí se mezi různými rhizobiálními kmeny liší. Nicméně i v pouštních půdách jsou známy rhizobiální populace, které jsou schopny efektivní nodulace i při omezené vlhkosti půdy (Osa-Afina a Alexander, 1982; Fuhrman et al., 1986; Busse a Bottomley 1989). Reakce nodulace a fixace dusíku ke stresu vody také závisí na růstovém stádiu vikkvité rostliny. Bylo zjištěno, že stres vodou přivolený během vegetativního růstu byl pro nodulaci a fixaci dusíku více škodlivý než během fáze reprodukce (Pena-Cabrialet et Castellanos, 1993).

Vysoká teplota

Vysoké teploty kořenů silně ovlivňují infekci bakteriemi a celkově fixaci dusíku (Munevar a Wollum, 1982; Kishinevsky et al., 1992; Hungria a Franco, 1993). Kritická teplota pro symbiotickou fixaci dusíku se u vikkvových rostlin liší, př. u jetele a hrachu byla zjištěna kolem 30 °C, pro sóju, podzemnici olejnou a vignonu čínskou v rozmezí 35 až 40 °C (Michiels et al., 1994) a pro fazoli 30 až 33 °C (Piha a Munnus, 1987).

Pro většinu rhizobií je optimální rozsah teplot pro růst v kultuře od 28 °C do 31 °C a mnoho z nich je neschopno růst při 37 °C (Graham, 1992). Kromě samotného růstu se účinek vysokých teplot projevil na rhizobiích obecně ztrátou schopnosti infikovat hostitelskou rostlinu, což se přisuzuje vlivu odstranění plazmidu (Karanja a Wood, 1988). Na druhou stranu byly v prostředí ovlivněných teplotním stresem izolovány teplotně tolerantní rhizobie, které se ovšem projevovaly méně efektivní fixací dusíku ve vikkvových rostlinách (Moawad a Beck, 1991). Rhizobiální přežití v půdě vystavené vysokým teplotám je vyšší v půdních agregátech než v půdách bez agregátů a je zvýhodňováno spíše podmínkami sucha než vlhkosti (Graham, 1992)

Vysoké teploty půdy zpomalují také nodulaci nebo ji omezují pouze na podpovrchovou oblast půdy (Graham, 1992), a bylo zjištěno, že za vysokých teplot probíhala silnější nodulace pouze v hlubší části půdy zatímco blíže povrchu byla nodulace velmi snižená (Munns et al., 1979).

Míra fotosyntézy a CO₂

Produkty fotosyntézy u rostlin se symbiotickou fixací dusíku slouží nejen pro udržení fyziologických funkcí a vlastnímu růstu ale navíc k energetickému zásobení rhizobií v hlízkách. Na každý gram dusíku obsaženého v aminokyselinách a amidech se v době největší syntetické aktivity hostitelské rostliny v hlízkových bakteriích spotřebují 4 g uhlíku obsaženého v sacharidech. Z toho důvodu výživa rostlin symbioticky fixovaným dusíkem vyžaduje větší aktivitu fotosyntézy než při asimilaci dusíku z půdy (Kaschuk et al., 2010).

Je známo, že při snížené fotosyntetické aktivitě rostliny se fixace dusíku snižuje nebo až ustává. K tomu může dojít např. při odstranění listů (Möllerová, 2006). Naopak pokles fotosyntézy sníženou dostupností fosforu, a tím poklesu aktivity enzymu Rubisco, se na fixaci dusíku přes vývoj hlízek neprojevil (Almeida et al., 2000). V opačném případě, ve studiích s obohacením vzduchu o volný CO₂ se ukázalo, že vzrůst CO₂ zřejmě přes zesílenou aktivitu fotosyntézy zvýšil fixaci dusíku, a tak dokáže zvýšit biomasu vikvovitých rostlin (Hungate et al., 1999; West et al., 2005).

2.2 Význam symbiotické fixace dusíku vikvovitých rostlin pro ekosystémy

V přírodních terestrických ekosystémech pochází asi 80 % dusíku dostupného rostlinám z biologické fixace, které se odhaduje na 122 milion tun dusíku za rok (Figueiredo et al., 2013) a z toho je celkově přibližně 80 % dusíku vytvořeno v rámci symbiotické fixace (Buchanan et al., 2015).

2.2.1 Symbiotická fixace dusíku v primární sukcesi

Ve většině přírodních ekosystémů je dusík hlavní živinou, která limituje rostlinou produkci, a jeho dostupnost tak silně ovlivňuje strukturu a funkci ekosystémů (Vitousek a Farrington, 1997). K nízkým hodnotám dostupného dusíku v půdě dochází zejména v raných fázích primární sukcese. Primární sukcesi předchází disturbance, která zpravidla obnaží půdní substrát (Walker a del Moral, 2011). Dokonce i málo destruktivní disturbance mohou způsobit ztráty dusíku vzhledem k jeho vysoké mobilitě v porovnání s jinými živinami, speciálně s fosforem. Následkem toho je vývoj sukcesní vegetace často limitován dostupností dusíku, a to i v ekosystémech, kde ho bylo před disturbancí dostatečné množství (Davidson et al., 2007)

V raných stádiích sukcese se tak vytváří podmínky, ve kterých je pro rostliny i za cenu vyšších nákladů výhodnější získávat dusík ze symbiotické fixace než ho přijímat z půdy. Proto vikvovité rostliny na počátku primární sukcese tolik prospívají oproti rostlinám závislých pouze

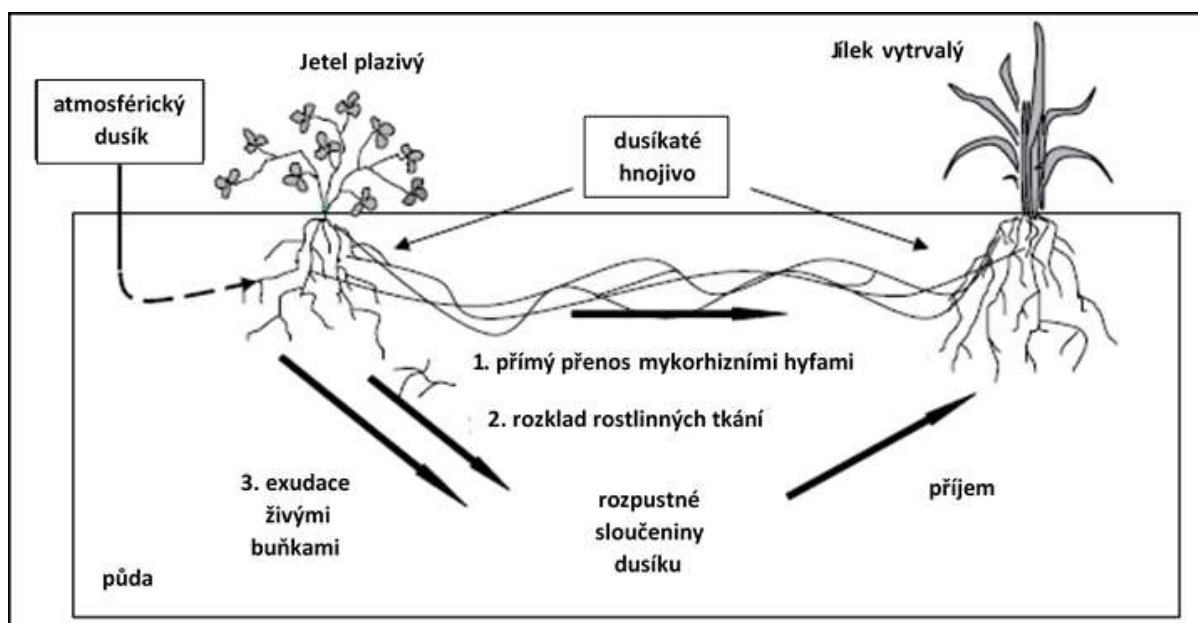
na příjmu dusíku z půdy (Waler a del Moral, 2003). Kromě nízkého množství dusíku v půdě k tomu přispívá i otevřený zápoj a dostatek světla (Rastetter et al., 2011). Vikvovité rostliny jsou tak dobře adaptovány na první kolonizaci a exploataci disturbovaných prostředí. Odráží to vysoká hustota a aktivita symbiotických fixátorů dusíku v půdě, i když ta je pozorována i během sekundární sukcese po velkých požárech (Perakis et al., 2011).

Ukazuje se, že vikvovité rostliny udržují ve svých listech vyšší množství dusíku než rostliny bez schopnosti symbiotické fixace. Zvýšené množství dusíku v listech pravděpodobně vysvětluje schopnost vikvovitých rostlin v podmínkách příznivého klimatu a dostatku světla účinně využívat vodu a produkovat obranné sloučeniny. Tyto mechanismy celkově zlepšují fitness a přežití vikvovitých rostlin (Adams et al., 2016).

2.2.2. Facilitace vikvovitými rostlinami

Přítomnost vikvovitých rostlin v raných stádiích primární sukcese zapadá do facilitačního modelu sukcese, který popsali Connell a Slatyer (1977). Ten pracuje obecně s myšlenkou, že první kolonizátoři, kteří osídlí obnaženou plochu, zlepšují podmínky stanoviště pro další kolonizátory, ale nikoli pro svoji vlastní reprodukci. Prvními kolonizátory jsou často právě vikvovité rostliny. Obohacením půdy o dusík díky schopnosti symbiotické fixace dusíku postupnělepší doposud nepříznivé podmínky, a tím mohou podpořit uchycení a růst dalších rostlin. Současně, zvýšené koncentrace dusíku v půdě vytváří méně výhodné prostředí pro strategii fixace dusíku, čímž vikvovité rostliny potlačují svůj vlastní růst.

Facilitace prostředí vikvovitými rostlinami probíhá několika mechanismy (Obr. 2). Za hlavní hnací sílu facilitativního účinku se považuje snížená kompetice okolních rostlin o půdní zásoby dusíku, tedy tzv. N-sparing. Protože vikvovité rostliny nejsou závislé na příjmu dusíku z půdy, je tento dusík „ušetřen“ pro sousední rostliny, které tím mohou přijímat více dusíku než v nepřítomnosti vikvovitých rostlin (Temperton et al., 2007).



Obr. 2: Možné způsoby facilitace vıkvovitými rostlinami (upraveno podle Paynel et al., 2001)

Druhotnou roli má přímý přenos fixovaného dusíku do okolních rostlin. Ten může probíhat v různých způsoby. Dusík může být přesouván přímo propojením systému kořenů rostlin prostřednictvím sítě mykorhizních hyf. Podle Rogers et al. (2001) tímto způsobem získávají okolní rostliny od vıkvovitých rostlin jen malé množství dusíku. Za druhé se dusík dostává do půdy skrze rhizodepozici, odkud je následně přijímán kořeny rostlin (Høgh-Jensen a Schjoerring, 2000; Rogers et al., 2001; Temperton et al., 2007). Rhizodepozice dusíku může probíhat vylučováním ve vodě rozpustných kořenových exudátů, které obsahují vyšší množství dusíku, než ty, které uvolňují rostliny bez symbiotické fixace dusíku (Paynel et al., 2001). Jedná se formy NH_4^+ a zejména o aminokyseliny (Ta a Faris, 1987; Brophy a Heichel, 1989) a bylo zjištěno, že je tímto způsobem odevzdáno do půdy až 30 % nafixovaného dusíku (Lesuffleur et al., 2007). Oproti relativně rychlému přímému přenosu dusíku probíhá dlouhodobá rhizodepozice v řádech měsíců a let přes degradaci mrtvých nadzemních i podzemních tkání vıkvovitých rostlin bohatých na obsah dusíku, kdy dusík podléhá dalším procesům přeměn nebo se akumuluje v půdě (Ledgard a Steele, 1992).

Vıkvovité rostliny hrají proto díky zlepšení kvality půdy přes symbiotickou fixaci dusíku klíčovou roli v udržování rovnováhy dusíku v ekosystémech. Přispěním dusíku se může významně zvýšit růst dalších rostlin, navíc přítomnost vıkvovitých rostlin ve společenstvu podporuje díky rozkladu jejich tkání vyšší mikrobiální aktivitu v půdě a tedy celkový obrat živin. Vıkvovité rostliny tudíž významným způsobem ovlivňují dynamiku vegetace a také urychlují tvorbu půdy (Walker,

1993; Spehn et al., 2002). V dlouhodobém měřítku by mohla jejich aktivita pomocí souvislé dodávky dusíku urychlit proces sukcese (Connell a Slatyer, 1977).

Množství dusíku, které jsou rostliny schopny fixací dusíku zachytit, se přirozeně liší mezi jednotlivými druhy vikvovitých rostlin a odvíjí se od podmínek v daném prostředí. Bylo zjištěno, že u některých vikvovitých rostlin může fixační kapacita dosáhnout až 500–600 kg N .ha⁻¹. rok⁻¹ (Möllerová, 2006). Jsou známy přibližné hodnoty ze zemědělských plodin (Tab. 1). Zvláště vysoké míry fixace dusíku lze pozorovat například v tropických savanách, kde vikvovité rostliny pokrývají velké plochy. Kvůli častým požárům zde v porovnání s fosforem a jinými živinám dochází ke ztrátám velkého množství dusíku a symbiotická fixace tak jeho dostupnost významně zvýší (Bustamante et al., 2006).

Tab. 1: Výkonnost fixace kg N. ha⁻¹. rok⁻¹ (upraveno podle Richter a Hlušek, 1994)

| Plodina | Průměrná hodnota | Rozpětí |
|-------------------|------------------|-----------|
| Vojtěška | 219 | 148 - 290 |
| Jetel plazivý | 198 | 128 - 268 |
| Bob | 146 | 121 – 171 |
| Vikev | 147 | 110 – 184 |
| Lupina (vlčí bob) | 139 | 121 - 157 |
| Hrách | 43 | 17 – 69 |

Pokud jde o narušené ekosystémy, je zde vzhledem k jiným faktorům prostředí míra fixace dusíku často nízká, přesto však dokáže uspokojit potřeby dusíku pro vikvovité rostliny (Graham a Vance, 2003)

Dostupnost dalších zdrojů totiž určuje, zda bude sukcese řízená kompeticí nebo facilitací (Koffel et al., 2018). Zdá se, že rozhodujícím faktorem je často dostupnost fosforu, a symbiotická fixace je tak mechanismem, který v terestrických ekosystémech propojuje dostupnost dusíku a fosforu. Na rozdíl od dusíku, je dostupnost fosforu na počátku sukcese většinou vysoká, a časem se zvětráváním a imobilizací v biotickém prostředí snižuje (Vitousek et al., 2010). Má se proto za to, že sukcese řízená facilitací bude probíhat při nízkých hodnotách dostupného dusíku a zároveň dostatečného množství fosforu (Koffel et al., 2018).

Zároveň, s postupující sukcesí a zlepšováním nepříznivých podmínek prostředí se facilitativní interakce budou snižovat a v pozdějších stádiích sukcese mohou dominovat konkurenční interakce (Callaway a Walker, 1997)

2.3 Vztah vikvovitých rostlin k růstu okolní vegetace

2.3.1 Přenos dusíku do okolních rostlin

Ukazuje se, že je dusík do okolních rostlin přesouván během růstového období (Rasmussen et al., 2007). Přesun dusíku z vikvovitých do sousedních rostlin může záviset na různých vlastnostech kořenů a strategiích růstu rostlin. Různá architektura kořenů může zajistit propojenost a blízký vztah s okolními vikvovitými rostlinami, které je pro přímý přesun dusíku potřeba (Pirhofer-Walzl et al., 2012). Protože luční společenstva vytváří rostliny s různými typy architektury kořenů (Braun et al., 2010), je zřejmé, že rychlost růstu kořenů, hustota jemných kořenů, biomasa a celkový povrch kořenů hrají důležitou roli v konkurenci o zdroje živin, jako je i dusík (Aerts et al., 1991; Casper a Jackson, 1997). Architektura kořenů může tudíž zlepšovat nebo bránit přenosu dusíku, a tím v rámci společenstva kompetičně zvýhodňovat nebo potlačovat růst určitých funkčních skupin rostlin nebo druhů.

Trávy jsou typické svým vláknitým kořenovým systémem (Kutschera a Lichtenegger, 1982), což přispívá k vyšší biomase a ploše kořenů, a tím i možnosti vysokého příjmu dusíku z vikvovitých rostlin (Braun et al., 2010). Oproti tomu hluboký kulovitý kořen s malým množstvím postranních kořenů u řady druhů bylin může bránit lepšímu propojení se sousedními kořeny vikvovitých rostlin, a tím získání dostupného dusíku. Na druhou stranu jsou díky tomu schopné získávat dusík z hlubších vrstev půdy (Kutschera a Lichtenegger, 1982; Pirhofer-Walzl et al., 2012).

Ze studií s těžkým izotopem dusíku ^{15}N je známo, že rostliny sousedící s vikvovitými rostlinami mají nižší hodnoty ^{15}N a vyšší obsah dusíku v půdě, což ukazuje, že přijímají více nafixovaného dusíku. Největší účinek má tento efekt na trávy (Temperton et al., 2007). Zřejmě kvůli povaze kořenů získávají byliny v porovnání s travami od vikvovitých rostlin menší množství dusíku, což by mohlo vysvětlovat, proč trávy reagují na přístupný fixovaný dusík více než byliny (Pirhofer-Walzl et al., 2012). Trávy tedy musí sdílet nafixovaný dusík se sousedními rostlinami, ale zejména při zvýšeném množství dusíku v půdě se trávy projevují jako velmi silní konkurenti o dusík (Høgh-Jensen a Schjoerring, 1997; Høgh-Jensen et al. 2006; Gylfadottir et al. 2007; Rasmussen et al. 2007)

Přenos dusíku řídí i samotné vikvovité rostliny, které se také odlišují architekturou kořenů, což by mohlo objasňovat, proč se mezi různými druhy vikvovitých liší přenos dusíku do okolních rostlin. Například jetel luční (*Trifolium pratense*) má kulovitý kořen, který může činit překážku ostatním rostlinám dostat se dostatečně blízko k jeho kořenům a získávat dusík. S ohledem na svoji strategii růstu po ztrátě listů v kořenech naopak akumuluje značné množství dusíku, což může být důvod, proč uvolňuje do půdy méně dusíku. Podobně jako jetel luční se chová tollice vojtěška (*Medicago sativa*). Oproti tomu jetel plazivý (*Trifolium repens*) poskytuje okolním rostlinám větší množství dusíku než dvě zmíněné, zřejmě proto, že nepotřebuje vytvářet vlastní zásoby dusíku v kořenech pro opětovný růst, vzhledem k tomu, že po ztrátě listů přetrvává v podobě podzemních výhonků (Kutschera a Lichtenegger, 1982; Barber et al., 1996; Wichern et al., 2008).

2.3.2 Dynamika interakcí vikvovitých rostlin a trav

Jak už bylo zmíněno, trávy jsou v rostlinných společenstvech obecně silnými konkurenty o dusík, a proto má blízká přítomnost vikvovitých rostlin zásadní vliv na růst právě této funkční skupiny rostlin. Společný růst vikvovitých rostlin a trav je vzhledem k množství studií široce zkoumán. Vikvovité rostliny investují oproti travám málo energie do kořenového systému a o to více do nadzemní biomasy (Körner et al., 2008; Poorter et al., 2015). To zřejmě vyplývá z toho, že kvůli symbiotické fixaci dusíku nepotřebují natolik rozvinutý kořenový systém pro získávání dusíku z půdy, což může umožnit sousedním rostlinám více rozvinout své kořeny (Weidlich et al., 2017).

Obě funkční skupiny rostlin rostou při společném růstu méně, než pokud vyrůstají samostatně. Konkuruje si vzájemně o příjem dusíku, na kterou vikvovité rostliny reagují zvýšenou mírou fixace dusíku. K rychlejšímu růstu vikvovitých rostlin ale dochází zřejmě pouze za optimálních podmínek, kterým je př. dostatečné zásobení fosforem (Cech et al., 2010). Zároveň také vzrůstá koncentrace NH_4^+ a aminokyselin v půdě, které jsou projevem zvýšené exudace (Paynel et al., 2008). Proces fixace dusíku je tedy přímo propojený s vylučováním dusíkatých exudátů.

Při společném růstu vzrůstá obsah dusíku v biomase trav, a ve studiích s izotopem ^{15}N , jehož snížené množství v rostlinách indikuje příjem fixovaného dusíku, bylo prokázáno, že obsah dusíku v travách je výsledkem rychlého přímého přenosu nafixovaného dusíku z vikvovitých rostlin, a vikvovitá rostlina tedy značným způsobem přispívá k výživě trávy (Beschow et al., 2010; Cech et al., 2010; McElroy et al., 2017). Akumulace dusíku v travách může být tedy více ovlivněna

požadavky trávy pro dusík než nabídkou dusíku od vikvovitých rostlin, což ukazuje, že konkurence o dusík mezi travami a vikvovitými rostlinami může být klíčovým faktorem účinnosti přenosu dusíku mezi těmito funkčními skupinami rostlin (McElroy et al., 2017).

Reakce rostlin na zvýšení dusíku v půdě

Na zvýšení dusíku v substrátu reagují vikvovité rostliny, vzhledem ke své strategii, snížením míry fixace dusíku, a tím klesá v jejich výživě podíl dusíku získaného fixací a naopak roste příjem dusíku z půdy. Tato změna ve zdroji dusíku se projevuje ve fyziologickém stavu jejich kořenů. Kořeny rostou rychleji, vzrůstá jejich biomasa (Voisin et al., 2002), ale klesá v nich obsah dusíku v podobě aminokyselin (Paynel et al., 2008). I když jsou vikvovité rostliny obecně typické poměrně mělkým kořenovým systémem (Hamblin a Tennant, 1987), při zvýšeném obsahu dusíku v půdě roste hloubka zakořenění, ale vznikající kořeny jsou slabší (Voisin et al., 2002).

Na druhou stranu tyto podmínky zřejmě neovlivňují vylučování dusíkatých exudátů (Paynel et al., 2008). Při zvýšených koncentracích dusíku v půdě trávy přijímají více nafixovaného dusíku z vikvovitých rostlin, což nakonec zvyšuje biomasu jejich kořenů a celkově podporuje růst trav. To je způsobeno efektivnějším příjmem dusíku travou, jednak díky zvýšené fixaci dusíku, ale i díky lepší exploataci půdy kořeny trávy, které tím mohou dosáhnout k více dostupným zdrojům dusíku (Elgersma et al. 2000; Paynel et al., 2008; Pirhofer-Walzl et al., 2012; McElroy et al., 2017). Právě snadnější přístup k minerálnímu dusíku v půdě má zřejmě význam zejména v podmínkách vysokých koncentracích půdního dusíku, kdy studie nezaznamenaly žádný přenos fixovaného dusíku do trav, navzdory tomu, že vlastní fixace dusíku s jistými omezeními probíhala (Beschow et al., 2010). Vikvovité rostliny reagují naopak na vysoké koncentrace dusíku snížením svého růstu, který je ale spíše výsledkem rychlejšího růstu trávy, tedy její konkurencí, než samotným zvýšením dusíku v půdě a omezením procesu fixace dusíku (McElroy et al., 2017).

2.3.3 Root foraging

V blízkosti rhizobiálních kořenů vikvovitých rostlin je kvůli výše uvedeným důvodům významně zvýšena dostupnost dusíku (Amosé et al., 2014; Ramirez-Garcia et al., 2014), a proto je růst v blízkosti kořenů vikvovitých rostlin potenciálně atraktivní. Kromě přímému čerpání dusíku pomáhají kořeny vikvovitých rostlin nepřímo k optimálnějšímu využití celkových zdrojů. Je známo, že kořenové exudáty kromě dusíku zpřístupňují anorganicky i organicky vázané živiny v půdě, zejména fosfor, draslík a železo (Paynel et al., 2001; Hasse et al., 2007). Vzhledem k těmto zvýhodněným podmínkám v blízkosti kořenů vikvovitých rostlin lze proto předpokládat,

že kořeny okolních rostlin budou mít tendenci směřovat ke kořenům vikvovitých rostlin (Faget et al., 2013). Tyto interakce mezi rostlinami sousedícími s vikvovitými rostlinami jsou jen minimálně prozkoumány, což odráží fakt, že růst kořenů je v reálných podmínkách ovlivňován velmi komplexním způsobem, jak přes dostupnost zdrojů, tak intenzitou kompetice a identitou sousedních rostlin. Doposud však toto směřování kořenů, známé jako root foraging, nebylo s určitostí prokázáno (Satter a Bertelheimer, 2018).

3. Materiál a metody

3.1 Odběr vzorků, příprava a průběh experimentu

Půdy použité v mém experimentu byly odebrány na Velké podkrušnohorské výsypce, která vznikla povrchovou těžbou hnědého uhlí na Sokolovsku v západních Čechách. Hlušinu tvoří terciérní jíly tzv. cyprisové formace, s minerály kaolinitem, montmorillonitem a illitem (Frouz et al., 2008).

Pro odběr půd bylo předem vybráno celkem 7 ploch lišících se svým stářím a způsobem vývoje, čímž vznikly dvě chronosekvence (Tab. 2). První chronosekvenci představovaly 4 plochy vyvíjející se spontánní sukcesí, jejichž stáří je 15, 20, 30 a 60 let - označení S15, S20, S30, S60. Jejich povrch se skládal ze souběžných hřbetů a sníženin vytvořených při navrstvování výsypek. Druhá chronosekvence zahrnovala 3 plochy, které byly v minulosti rekultivovány, tedy byl urovnán povrch a vysázeny olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) a olše šedé (*Alnus incana*). Jejich stáří je 15, 20 a 60 let - označení R15, R20, R60. Popisovaná stáří zkoumaných ploch odpovídají době od jejich poslední velké disturbance. V případě ploch vyvíjejících se spontánní sukcesí to odpovídá době nasypání substrátu na výsypku, v případě rekultivovaných ploch stáří odpovídá době od ukončení urovnání povrchu před výsadbou (Mudrák et al., 2010).

Tab. 2: Přehled ploch pro odběr půd

| název plochy | stáří | způsob obnovy | označení | pozn. |
|--------------|--------|---------------|----------|---|
| E | 15 let | sukcese | S15 | srovnaný terén, holá půda bez humusu |
| S1 | 20 let | sukcese | S20 | zvlněný terén, porost třtiny, nálety vrby |
| S2 | 30 let | sukcese | S30 | lesík s vrbou, topolem, břízou |
| V. | 60 let | sukcese | S60 | les s vrbou, topolem, břízou |
| EMA | 15 let | rekultivace | R15 | smíšený porost olše lepkavé a šedé |
| A1 | 20 let | rekultivace | R20 | smíšený porost olše lepkavé a šedé |
| RÍZL | 60 let | rekultivace | R60 | hustší porost olše lepkavé a šedé |

Odběr půd probíhal na všech místech ve stejnou dobu (říjen 2016). Na každé ploše bylo do pytlů odebráno potřebné množství půdy. Vždy byla nejprve odhrnuta svrchní vrstva opadu, a následně rýčem odebrána půda do hloubky asi 15 cm. Po převezení do laboratoře byla půda

nadrcena přes síto (velikost ok 6 mm) a vyčištěna od kořínků a kamenů, a tak připravena k následnému založení experimentu ve skleníku (Obr. 3).



Obr. 3: Příprava půdy

Každý ze 7 typů připravených půd byl nasypán do připravených plastových květináčků (7x7x8 cm). Do každého typu půdy byly postupně nasety jednotlivě 3 druhy rostlin z čeledi Fabaceae: jetel luční (*Trifolium pratense*), štírovník růžkatý (*Lotus corniculatus*) a vikev ptačí (*Vicia cracca*). Ve všech typech půd byly vikvovité rostliny nasety ve dvou variantách. V první variantě samostatně a ve druhé variantě společně s lipnicí smáčknotou (*Poa compressa*). Dále vznikla třetí varianta, kdy byla do půdy naseta tráva samostatně, a ve čtvrté variantě, která sloužila jako kontrola, nebylo do půdy zaseto nic. Každá ze zmíněných variant měla 4 opakování. Celkem bylo tímto způsobem založeno 224 květináčků (Obr. 4). Byly umístěny do skleníku, ve kterém byly ponechány 5 měsíců. Prvních 7 týdnů se rostlinám dosvětlovalo LED lampami (124 W/m²), aby bylo dosaženo L/D 12/12. Rostliny byly podle potřeby celou dobu zalévány. Nebyla použita žádná hnojiva.



Obr. 4: Experiment ve skleníku

3.2 Metodika měření

Po 5 měsících byl experiment s růstem rostlin ukončen. Rostliny byly nejprve ostříhány pro stanovení nadzemní biomasy, v půdě byly měřeny různé parametry a nakonec byla půda promyta pro stanovení biomasy kořenů

3.2.1 Stanovení nadzemní biomasy rostlin

Nadzemní části rostlin z každého květináčku byly nůžkami těsně u povrchu půdy ostříhány, usušeny při 40 °C do konstantní hmotnosti a po vychladnutí zváženy.

3.2.2 Stanovení podzemní biomasy rostlin

Po navážení půdy pro všechna plánovaná stanovení byla zbývající půda s kořeny promyta nad cedníkem a sítím, po odplavení půdy byly kořeny usušeny při 40 °C do konstantní hmotnosti a po vychladnutí zváženy.

Ve variantě, kde rostly vikvovité rostliny společně s travou, nebylo možné kořeny druhově oddělit, a tak zvážená podzemní biomasa v této variantě odpovídá hmotnosti kořenů z celého květináčku.

3.2.3 Stanovení vlhkosti půdy

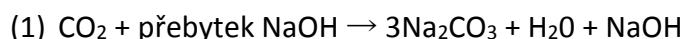
Do předem zvážených hliníkových váženek označenými čísly byly naváženy asi 3 g čerstvé půdy ve dvou opakováních. Následně byla zvážena váženka i s půdou, a poté byly vzorky vysušeny v sušárně při 40 °C do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí byly vzorky opět zváženy. Podle níže uvedeného vzorce byla vypočítána vlhkost půdy. Výsledkem je bezrozměrné číslo, které udává podíl volně vázané vody na 1 g čerstvého vzorku.

$$S = 1 - \frac{(m_{suš} - m_{váž})}{(m_{nesuš} - m_{váž})}$$

| | |
|-------------|---|
| $m_{váž}$ | hmotnost váženky (g) |
| $m_{nesuš}$ | hmotnost váženky s půdou před vysušením |
| $m_{suš}$ | hmotnost váženky s půdou po vysušení |

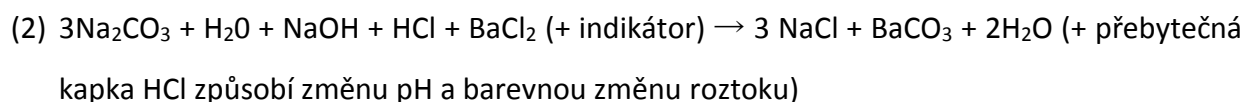
3.2.4 Stanovení bazální respirace půdy titrační metodou

Do 100 ml sérovek (skleněné nádoby s modrým víčkem a těsněním) bylo naváženo po 10 g čerstvé půdy a do nich vložen kalíšek se 3 ml 1M NaOH. Dále byly založeny také 3 slepé vzorky (BLANKY), které obsahovaly jen kalíšek s NaOH. Sklenice byly řádně uzavřeny víčkem a při laboratorní teplotě inkubovány po dobu 3 dnů. Byl zaznamenán čas počátku a konce inkubace. V průběhu inkubace se CO₂ produkovaný půdními organismy absorbuje v roztoku NaOH podle následující rovnice:



Po ukončení inkubace bylo nejprve nutné stanovit faktor HCl. Do kádinky bylo naváženo přesně 0,200 g tetraboritanu sodného, a po přilítí 20 ml destilované vody byla směs rozmíchána na míchadle. Po přidání několik kapek indikátoru methyloranž probíhala titrace HCl od žlutého po oranžové zbarvení. Spotřeba HCl se použila pro výpočet přesné koncentrace kyseliny.

Následovala vlastní titrace vzorků. Kalíšky byly vyndány ze sklenic a zbývající NaOH byl vylit do kádinky. Kalíšky byly dvakrát propláchnuty destilovanou vodou, která byla vylita taktéž do kádinky, čímž byl zachycen všechn NaOH. Do kádinky byly přidány 3,5 ml BaCl₂ a několik kapek indikátoru fenolftaleinu. Směs byla titrována HCl až do bodu ekvivalence, tedy odbarvení červeně (2). Byla zaznamenána spotřeba HCl v ml a čas titrace pro konečný výpočet.



Výpočet bazální respirace byla proveden podle následující rovnice:

$$R = \frac{(A - B) \times C_{HCl} \times 6005}{\text{navážka} \times \text{sušina} \times \text{doba inkubace}} [\mu\text{g C} - \text{CO}_2 \cdot \text{g půdy}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}]$$

A spotřeba HCl při titraci BLANKu [ml]

B spotřeba HCl při titraci vzorku [ml]

C_{HCl} přesná koncentrace roztoku tetraboritanu sodného HCl v mol^{-1}

$$C_{HCl} = \frac{10,489}{\text{faktor HCl}} \times 0,1$$

6005 přepočtový koeficient

3.2.5 Stanovení pH v půdě

Do plastových lahvíček o objemu 250 ml bylo naváženo po 3 g vysušené půdy a přidáno 15 ml deionizované vody. Uzavřené lahvičky byly umístěny do třepačky a ponechány 1 hodinu třepat. Následující den byly vzorky zfiltrány do plastových lahvíček. Hodnota pH byla změřena pH metrem s kombinovanou elektrodou, údaj byl odečten po ustálení po 10 minutách.

3.2.6 Stanovení dostupného fosforu v půdě spektrofotometricky

Dostupný fosfor byl stanoven metodou extraktu půd podle Mehlicha III. V tomto roztoku se vysušené a zhomogenizované vzorky půd extrahují. Uvolněný fosfor tvoří s molybdenanem amonným v kyselém prostředí kyselinu molybdatofosforečnou. Ta je redukována v přítomnosti kyseliny askorbové a antimonu na fosfomolybdenanovou modř. Intenzita modrého zbarvení odpovídá množství fosforu v extraktu a měří se na spektrofotometru při vlnové délce 889 nm.

Příprava extrakčního roztoku podle Mehlicha III.: V asi 300 ml deionizované vody bylo rozpuštěno 40 g dusičnanu amonného a přidáno 8 ml NH_4F + EDTA (Chelaton II), dále 23 ml kyseliny octové a 1,65 ml kyseliny dusičné. Vše bylo postupně přelito do 2000 ml baňky, doplněno po rysku deionizovanou vodou a důkladně promícháno. Roztok byl vytemperován na laboratorní teplotu.

Do plastových lahvíček bylo naváženo po 1 g vysušené půdy a přidáno vždy 100 ml připraveného extrakčního roztoku Mehlicha III. Navíc byl připraven referenční vzorek, a to z 5 g půdy se známým množstvím dostupného fosforu a 50 ml Mehlicha III. Nakonec byl založen slepý vzorek (BLANK) z 50 ml Mehlicha III. Uzavřené nádoby byly umístěny do třepačky na dobu 30 minut.

Protřepané vzorky byly přefiltrovány do připravených plastových nádobek o objemu 100 ml.

Dále se do kuželové baňky s výpustí a zátkou připravilo směsné činidlo. Do baňky se odměrnými válci dávkovala už dříve připravená činidla v přesném pořadí: 25 ml zředěné kyseliny sírové o koncentraci $2,6 \text{ mol.l}^{-1}$; 10 ml roztoku molybdenanu amonného; 10 ml roztoku kyseliny askorbové; 5 ml roztoku vinanu antimonylo-draselného. Dále bylo přidáno 10 ml butanolu, kterým se směsné činidlo čistí od nežádoucího fosforu. Po uzavření zátkou se baňka důkladně protřepala dnem vzhůru, zakryla alobalem, a poté se nechala směs asi 1,5 hodiny ustálit. Postupně se směs rozdělila na dvě barevně odlišné části: ve svrchní (modré) zůstal vyextrahovaný fosfor s butanolem. Ve spodní části tak zůstalo vyčištěné činidlo, které se vypustilo a dále použilo.

V dalším kroku byla do pěti odměrných baněk o objemu 50 ml vymytých 5% kyselinou dusičnou připravena série kalibračních standardů. Kalibrační řadu tvořilo 5 standardů s koncentrací fosforu (mg.l^{-1}) 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5.

Do připravených zkumavek označených čísly bylo vždy napipetováno 1 ml extraktu z půdy, blanku a standardů; přidalo se 8 ml HClO_3 a 1 ml činidla 2 ($\text{NH}_4\text{F}+\text{EDTA}$). Obsah zkumavek byl promíchán a ponechán asi 10 min ustálit.

Přítomnost fosforu ve vzorku se projevila jeho modrým zbarvením. Stanovení fosforu probíhalo ve spektrofotometru GENESYS 10S UV-VIS při vlnové délce 889 nm. Z naměřené řady standardů byla vytvořena kalibrační křivka, a z ní se vypočetla koncentrace fosforu extrahovaného ze vzorků půd.

3.2.7 Stanovení dostupného železa v půdě

Pro stanovení železa v půdě bylo využito zbylých extraktů půd roztokem Mehlicha III. ze stanovení dostupného fosforu podle metodiky Zbírala (2016). Železo se stanovilo pomocí optického spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES).

3.2.8 Stanovení uhlíku mikrobiální biomasy fumigačně extrakční metodou (TOC), celkového dusíku (TN) a poměru C:N

Fumigačně extrakční metodou se měří přímo uhlík mikrobiální biomasy uvolněný z mikrobiálních buněk po fumigaci půdy v parách chloroformu.

Vzorek se rozdělí na dvě části. Z první se vyextrahují rozpustné uhlíkaté látky, na druhou se působí parami chloroformu (fumigace), čímž se do půdního roztoku uvolní obsah buněk mikroorganismů a extrakce rozpustných uhlíkatých látek se provede až po fumigaci. V obou

variantách se stanoví uhlík. Rozdíl změřeného uhlíku v extraktech po fumigaci a před fumigací odpovídá obsahu uhlíku v mikrobiálních buňkách.

Do 100 ml sérovek bylo naváženo 5 g čerstvé půdy. Do poloviny sérovek se nalilo 40 ml K₂SO₄ a ponechalo 45 minut třepat na třepačce. Po vytřepání byly vzorky zfiltrovány a byl zfiltrován i čistý K₂SO₄ (BLANK). Filtrát byl uchován v mrazáku až do analytické koncovky.

Druhá polovina sérovek se otevřená vložila do exikátoru vyloženého navlhčeným filtračním papírem a navrch se položila miska s rozbitým sklem a 50 ml chloroformu. Exikátor se zavřel a vývěvou odsával vzduch do té doby, dokud z misky s chloroformem nezačaly unikat bublinky a exikátor se tak nenaplnil parami chloroformu. Páry chloroformu se nechaly působit na vzorky tři dny. Po uplynutí této doby se ke vzorkům přidalo 40 ml K₂SO₄ a nechalo třepat 45 min na třepačce. Po vytřepání se vzorky i čistý K₂SO₄ (BLANK) zfiltrovaly a uložily do mrazáku.

Po rozmražení se vzorky ve scintilačkách v ruce protřepaly a následně se pomocí pipety naředily destilovanou vodou v poměru 1:4 do speciálních nádobek; standardy se ředily 1:10. Vzorky se umístily do stojanu a ten se vložil do analyzátoru TOC (Total organic carbon analyzer). K analyzátoru byl připojen modul na měření dusíku (Total nitrogen measuring unit). Byl tak změřen celkový organický uhlík (TOC) i celkový dusík (TN) ve vzorcích. Naměřené hodnoty byly přepočteny na µg uhlíku resp. dusíku na g suché půdy. Pro výpočet byly využity hodnoty sušiny z předchozích stanovení. Nakonec byl stanoven poměr C:N.

Výpočet celkového organického uhlíku (TOC):

Pro fumigované i nefumigované vzorky se zvlášť vypočetl obsah uhlíku, a následně se jejich rozdílem získal celkový obsah uhlíku mikrobiální biomasy [µg C .g suché půdy⁻¹]:

$$C = \frac{(cVzorku - cBlanku) \times 0,04}{(5 \times sušina)} \times 1000$$

$$C_{mic} = \frac{(C_{fumig} - C_{nefumig})}{0,38}$$

0,04 objem K₂SO₄ (ml)

5 váha vzorku (5 g půdy)

0,38 přepočtový faktor

Výpočet celkového dusíku (TN):

Pro fumigované i nefumigované vzorky se zvlášť vypočetl obsah N, a následně se jejich podílem získal celkový obsah dusíku mikrobiální biomasy [$\mu\text{g N.g suché půdy}^{-1}$]:

$$C = \frac{(cVzorku - cBlanku) \times 0,04}{(5 \times sušina)} \times 1000$$

$$Nmic \frac{(Cfumig - Cnefumig)}{0,54}$$

0,04 objem K_2SO_4 (ml)

5 váha vzorku (5 g půdy)

0,54 přepočtový faktor

3.3 Statistické zpracování dat

Získaná data byla zapsána a upravena v programu Microsoft Office Excel a následně statisticky vyhodnocena v programu R verze 3.3.2. Pro zjištění, zda jsou jednotlivé parametry signifikantně ovlivněny věkem ploch, způsobem jejich obnovy (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompeticí s travou, bylo využito metody obecných lineárních modelů GLM (generalized linear models). Ke zhodnocení, zda je pro jednotlivé parametry signifikantní vliv interakce kompetice a plochy, byla použita metoda dvoucestné analýzy variance (two-way ANOVA).

4. Výsledky

4.1 Růst vikvovitých rostlin a trávy *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Výsledky GLM (Tab. 3) ukazují, že vikev nebyla statisticky významně ovlivněna žádným ze sledovaných faktorů, patrně díky malému množství vzešlých jedinců. Jetel i štírovník byly statisticky významně ovlivněny jak věkem plochy, tak rozdílem mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. U štírovníku byl navíc statisticky významný vliv kompetice s trávou a byla též signifikantní interakce konkurence a plochy. U jetele byl vliv kompetice pouze marginálně významný (Tab. 3).

Tab. 3: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na růst vikvovitých rostlin a na růst trávy v kompetici s jednotlivými druhy vikvovitých rostlin. Výsledky dvoucestné ANOVY (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| nadzemní biomasa | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|----------------------|--------------|-----------------------|--------------|------------------------------|
| jetel | 1.85e-05 *** | 7.86e-06 *** | 0.0592 | 0.410944 |
| štírovník | 3.64e-05 *** | 1.53e-09 *** | 0.00481 ** | 0.00655 ** |
| vikev | 0.88864 | 0.38095 | 0.19231 | 0.3003 |
| tráva s jetelem | 0.297 | 5.57e-05 *** | 1.29e-05 *** | 3.838e-11 *** |
| tráva se štírovníkem | 0.00553 ** | 1.35e-06 *** | 8.89e-05 *** | 7.044e-07 *** |
| tráva s vikví | 0.0103 * | 1.34e-07 *** | 0.6460 | 3.021e-06 *** |

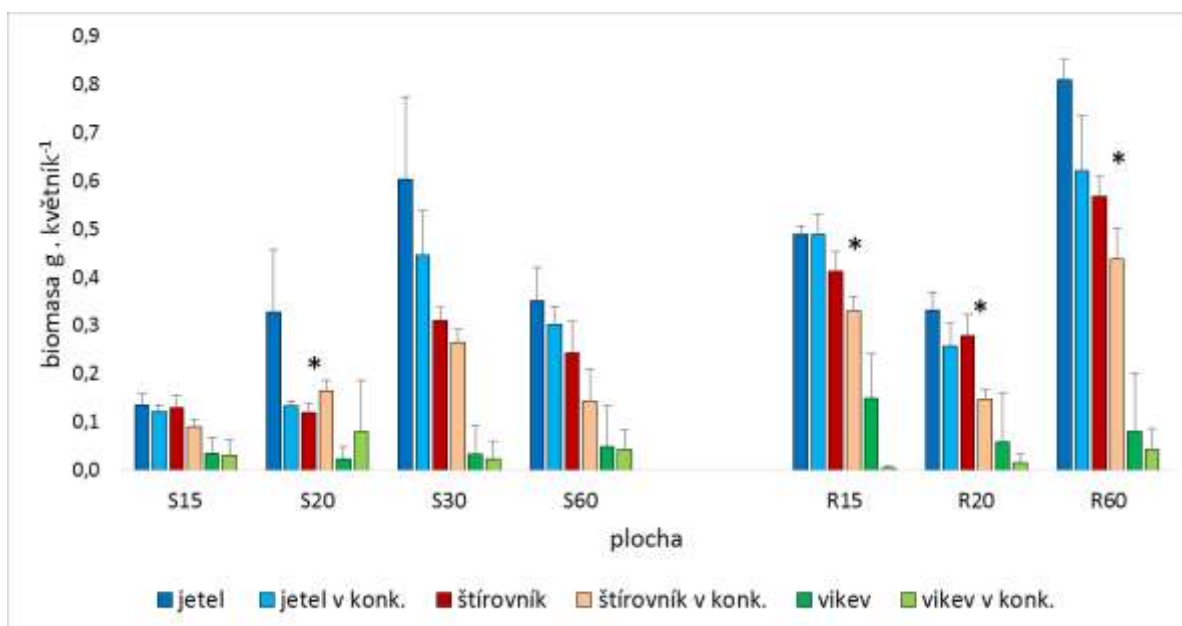
Podíváme-li se na jednotlivé druhy podrobněji (Obr. 5) vidíme, že růst sledovaných tří druhů vikvovitých rostlin se mezi sebou lišil. Nejlépe se v substrátu dařilo jeteli, o něco méně štírovníku a vikev vyrostla velmi málo, jen asi v 1/2 vzorků, a to většinou jen v 1 ze 4 opakování. Celkově lze konstatovat, že růst jetele a štírovníku ukázal v rámci studovaných ploch podobný průběh. Oba druhy rostly celkově rychleji na plochách rekultivovaných než na plochách sukcesních. Nejnižší biomasa obou rostlin byla naměřena na nejmladších sukcesních plochách (S15, S20) a nejvyšší naopak na nejstarších rekultivovaných plochách (R60). Vliv rekultivace byl natolik významný, že jetel i štírovník rostly rychleji na nejmladší rekultivované ploše (R15) než na nejstarší sukcesní ploše (S60).

Růst jetele se významně lišil se stářím zkoumaných ploch, na starších plochách rostl jetel rychleji než na mladších plochách. Nejméně rostl na nejmladší sukcesní ploše (S15) a nejvíce naopak na nejstarší rekultivované ploše (R60), kde je biomasa vůbec nejvyšší ze všech

treatmentů mého experimentu. Na středně starých plochách (S20, R20) byla biomasa jetele i přes významný rozdíl na nejmladších plochách srovnatelná (Obr. 5). Na nejstarší sukcesní ploše (S60) bylo naměřené množství biomasy podobné té na středně starých plochách (S20, R20), a tedy významně nižší než na stejně staré rekultivované ploše (R60). V konkurenci s trávou rostl jetel o něco pomaleji, a to zejména na starších plochách, zatímco pokles není patrný na nejmladších plochách (S15, R15).

Průběh růstu štírovníku má podobný trend jako v případě jetele, ovšem množství biomasy je celkově nižší (Obr. 5). Růst se mezi jednotlivými plochami významně lišil, nejnižší biomasa štírovníku byla změřena na dvou nejmladších sukcesních plochách (S15, S20) a nejvyšší byla stejně jako v případě jetele zjištěna na nejstarší rekultivované ploše (R60). V konkurenci s trávou rostl štírovník významně pomaleji, zejména na rekultivovaných plochách, s výjimkou plochy S20, kde je tomu naopak a kde štírovník dosahoval vyšší biomasy ve variantách s konkurencí trávy (Obr. 5). Účinek konkurence se mezi jednotlivými plochami významně liší.

Nadzemní biomasa vikve byla celkově velmi nízká (Obr. 5). Zdá se ovšem, že stejně jako jetel a štírovník rostla vikev celkově lépe na rekultivovaných plochách. Nejvyšší biomasy vikev dosáhla při samostatném růstu překvapivě na nejmladší rekultivované ploše (R15), na stejné ploše v konkurenci s trávou vikev naopak téměř nebyla schopna vyrůst. Rozdíl mezi biomasou vikve při samostatném růstu oproti růstu v konkurenci s trávou není na sukcesních plochách tak velký jako na rekultivovaných plochách, a na ploše S20 je dokonce biomasa vikve v konkurenci s trávou vyšší než bez konkurence (Obr. 5).

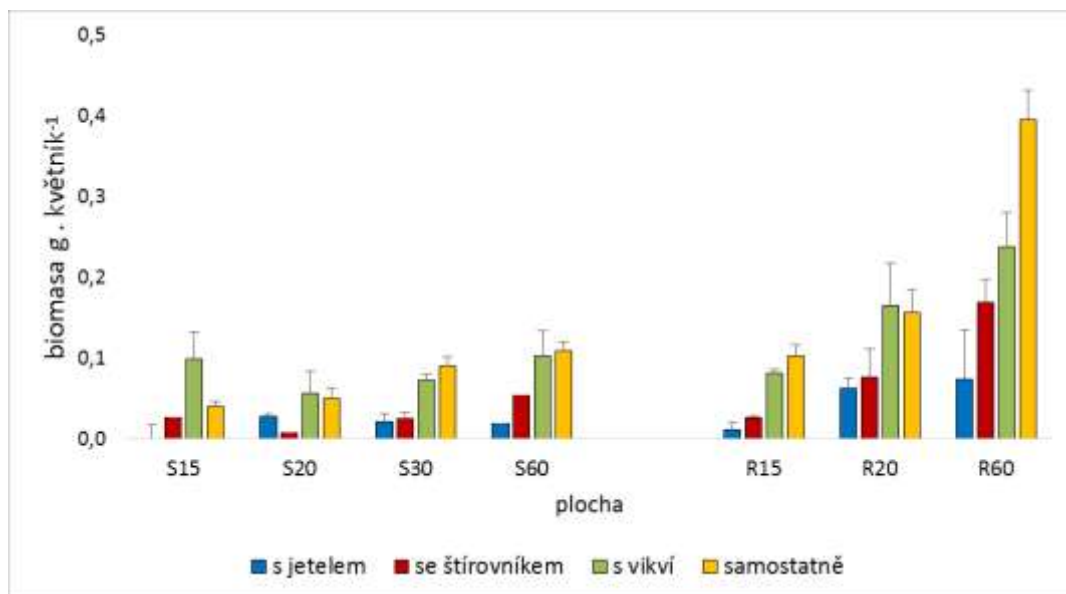


Obr. 5: Nadzemní biomasa vikvovitých rostlin rostoucích v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku. Výsledky T-testu mezi variantami s a bez kompetice – pokud je signifikantní ($p < 0,05$), je označen hvězdičkou.

Z výsledků GLM dále vyplývá, že růst trávy společně se štírovníkem a vikví byl statisticky významně ovlivněn věkem plochy, v případě růstu trávy s jetelem se vliv věku neprokázal. Naopak růst trávy byl statisticky významně ovlivněn kompeticí jetele a štírovníku, kompetice vikve významná nebyla zřejmě kvůli jejímu omezenému růstu. Růst trávy spolu se všemi vikvovitými rostlinami se statisticky významně lišil mezi rekultivovanými a sukcesními plochami a současně se u nich prokázala signifikantní interakce konkurence a plochy (Tab. 3).

Na (Obr. 6) je dobře vidět, že biomasa trávy ve všech variantách s rostoucím věkem postupně rostla. Na rekultivovaných plochách je tento trend obecně výraznější než na plochách sukcesních, a tráva tedy obecně rostla rychleji na plochách sukcesních než rekultivovaných. Na nejmladší rekultivované ploše (R15) je biomasa trávy, která rostla samostatně, srovnatelná s tou naměřenou na nejstarší sukcesní ploše (S60). Růst trávy společně s různými vikvovitými rostlinami se výrazně liší. V konkurenci s jetelem a štírovníkem tráva rostla podstatně méně než v konkurenci vikví, která sama ve většině vzorků nevyrostla, a tak neomezovala růst trávy. Biomasa trávy v konkurenci s vikví je tak na většině ploch srovnatelná s biomasou trávy rostoucí samostatně a na nejmladší sukcesní ploše (S15) ji dokonce převyšuje. Naopak jetel a štírovník si s trávou konkurovali, a na stejné ploše (S15) byla tráva jetelem potlačena úplně. Nejvíce tak tráva

rostla samostatně a na nejstarší rekultivované ploše (R15) dosáhla několikanásobně vyšší nejvyšší biomasy než v jiných variantách (Obr. 6).



Obr. 6: Nadzemní biomasa trávy rostoucí v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucí buď v kompetici s vikvovitými rostlinami, nebo bez kompetice (samostatně). Úsečky značí směrodatnou odchylku.

Dále byla pomocí GLM statisticky testována míra účinku konkurence na růst vikvovitých rostlin a na růst trávy. Z výsledků vyplývá (Tab. 4), že jak biomasa jetele a štírovníku, tak biomasa trávy, se s rostoucím věkem statisticky významně zvyšovaly; ve variantě s vikví se tento fakt nepotvrdil. Ve všech variantách se statisticky významně lišila biomasa vikvovitých rostlin a trávy. Zatímco biomasa jetele a štírovníku byla vždy vyšší než biomasa trávy, u vikve tomu bylo naopak, což odráží fakt, že se vikev celkově málo vyvíjela. V případě varianty s jetelem a štírovníkem se potvrdil statisticky významný rozdíl mezi tím, zda rostliny rostly samostatně nebo s jinou rostlinou, přičemž biomasa rostlin v konkurenci byla vždy nižší. Ve variantě s vikví konkurence také biomasu rostlin snížila, ale nebylo to statisticky významné. Neprokázala se signifikantní interakce biomasy jednotlivých rostlin a kompetice, čili se nepotvrdilo, že by byl růst trávy výrazněji omezen přítomností vikvovité rostliny, než je vikvovitá rostlina omezena přítomností trávy.

Tab. 4: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, druhu rostlin (vikvovité r. vs. tráva) a vzájemné kompetice s trávou na růst vikvovitých rostlin. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci druhu rostliny a kompetice. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| nadzemní biomasa | věk | druh | kompetice | interakce (druh:kompetice) |
|------------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------|
| jetele | 0.000304 *** | 2.84e-16 *** | 0.003506 ** | 0.99856 |
| štírovník | 0.000435 *** | 1.19e-12 *** | 0.000723 *** | 0.782 |
| vikve | 0.366 | 9.94e-06 *** | 0.502 | 0.2149 |

4.2 Růst kořenů vikvovitých rostlin a trávy *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Výsledky GLM ukazují, že růst kořenů ve všech variantách byl statisticky významně ovlivněn stářím plochy. Růst kořenů jetele a štírovníku se navíc statisticky významně lišil mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. Vliv kompetice trávy u těchto dvou rostlin neměl statisticky významný vliv, stejně jako nebyla signifikantní interakce kompetice a plochy. U vikve a v kontrole tomu bylo naopak, prokázal se statisticky významný účinek kompetice, a u vikve byla navíc signifikantní interakce kompetice a plochy (Tab. 5).

Tab. 5: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na růst kořenů vikvovitých rostlin a na růst kořenů trávy bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| podzemní biomasa | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|------------------|------------|-----------------------|--------------|------------------------------|
| jetele | 0.0109 * | 0.0057 ** | 0.6331 | 0.700699 |
| štírovník | 0.048089 * | 0.000524 *** | 0.792635 | 0.2734463 |
| vikve | 0.00189 ** | 0.16915 | 0.04144 * | 0.01974 * |
| kontrola | 0.0472 * | 0.2422 | 4.66e-05 *** | 0.09655 |

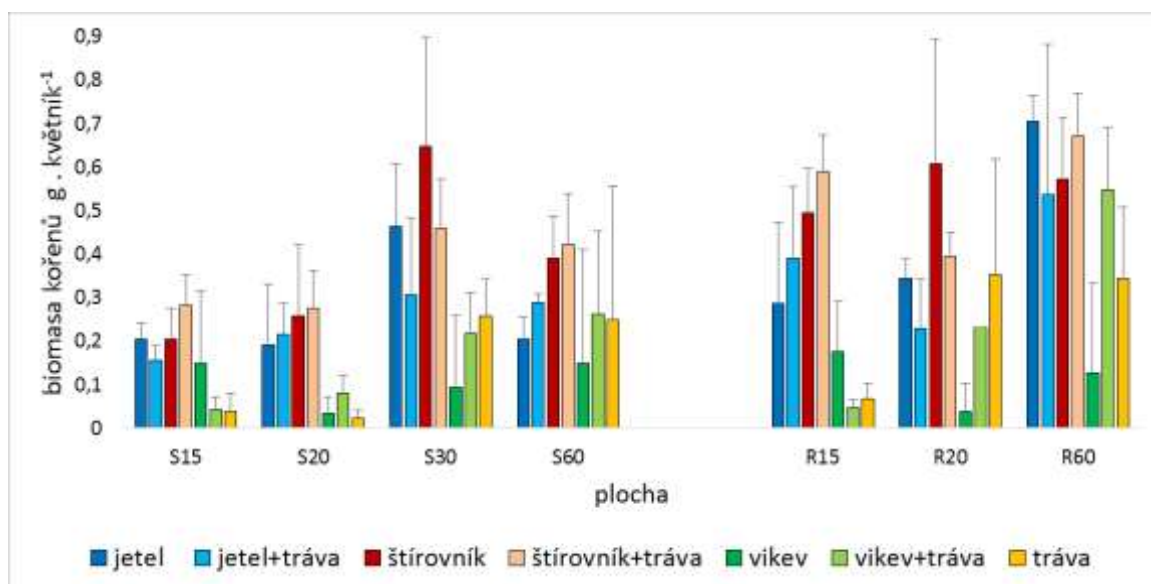
Při pohledu na Obr. 7 je vidět, že biomasa kořenů se mezi druhy rostlin lišila, ale ve všech variantách se s věkem zvyšovala. Biomasa kořenů jetele a štírovníku je celkově značně vyšší než biomasa kořenů vikve a trávy v kontrole, přičemž kořenů štírovníku je o něco více než jetele. Kořeny jetele a štírovníku rostly rychleji na rekultivovaných plochách než na sukcesních, kde růst jejich kořenů ukazuje podobný průběh s píkem na středně staré ploše (S30), stejně jako je tomu u jejich nadzemní biomasy. Biomasa kořenů štírovníku je na této sukcesní ploše (S30) dokonce

vyšší než na nejstarší rekultivované ploše (R60). Na nejstarší sukcesní ploše (S60) byla biomasa kořenů jetele mnohonásobně nižší než na nejstarší rekultivované ploše (R60).

I když byly kořeny rostlin ve variantách konkurence s trávou váženy dohromady, společný růst trávy s jetelem a štírovníkem celkovou biomasu kořenů nezvýšil. Na některých mladých a středně starých plochách byla celková biomasa vikvovité rostliny a trávy dokonce nižší než ve variantách bez trávy (Obr. 7). Konkrétně tomu tak bylo u jetele na plochách S15, S30 a R20 a u štírovníku na S30 a R20.

Vzhledem k obecně nízkému růstu vikve byla i její biomasa kořenů nízká (Obr. 7). Mezi chronosekvencemi se biomasa kořenů významně nelišila, i když na sukcesních plochách byla spíše nižší. V konkurenci s trávou byla biomasa kořenů významně vyšší, což se nejvíce projevilo na starších plochách (S30, R30, S60, R60), kde kořeny trávy zřejmě podstatně zvýšily celkovou biomasu kořenů.

Růst kořenů samotné trávy se s rostoucím stářím ploch zvyšoval (Obr. 7), ale stejně jako v případě vikve nebyl významný rozdíl mezi sukcesními a rekultivovanými plochami, i když na sukcesních plochách rostly kořeny spíše méně. Kořeny trávy, která rostla v kontrolní půdě sama, byly na mladých plochách (S15, S20, R15) zcela zanedbatelné, v pozdějších stádiích ale jejich biomasa výrazně vzrostla. Na starších rekultivovaných plochách (R20, R60) dosáhla jen o něco málo vyšších hodnot než na starších sukcesních plochách (S30, S60). Na nejstarší sukcesní ploše (S60) byla biomasa kořenů trávy v kontrolní půdě srovnatelná s biomasou kořenů jetele.



Obr. 7: Podzemní biomasa vikvovitých rostlin a trávy rostoucích v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou; v konkurentních vzorcích nebyly odlišeny kořeny vikvovitých rostlin od kořenů trávy, a naměřené hodnoty tedy odpovídají biomase kořenů celých květináčků. Úsečky značí směrodatnou odchylku.

4.3 Vlhkost půdy s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Výsledky GLM ukazují, že vlhkost půdy v žádné z variant nebyla statisticky významně ovlivněna kompeticí s trávou. V půdě s jetelem byl statisticky významný vliv věku ploch. V půdě s vikví a v kontrolní půdě se statisticky významně lišila vlhkost půdy mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. Interakce kompetice a plochy byla statisticky významná pouze v kontrolní půdě (Tab. 6).

Tab. 6: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na vlhkost půdy s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|--------------|--------------|-----------------------|-----------|------------------------------|
| vlhkost půdy | | | | |
| jetel | 9.23e-05 *** | 0.352 | 0.351 | 0.1974 |
| štírovník | 0.064 | 0.959 | 0.876 | 0.0971 |
| vikev | 0.13421 | 0.00233 ** | 0.50539 | 0.3606 |
| kontrola | 0.06006 | 0.00152 ** | 0.07571 | 0.0443457 * |

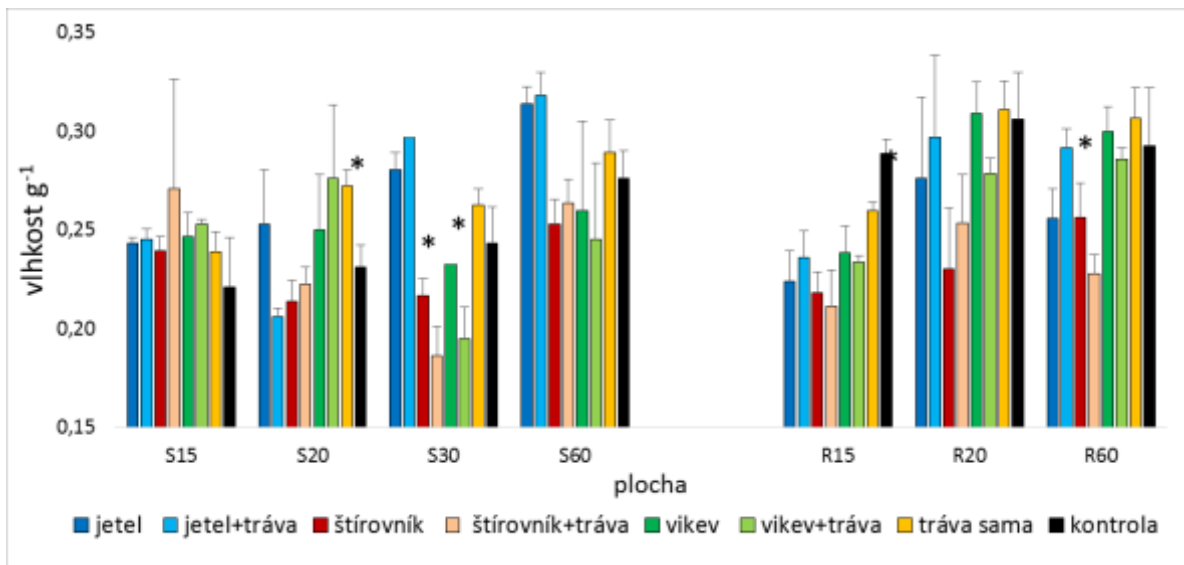
Při pohledu na Obr. 8 je patrné, že se vlhkost půdy celkově pohybovala v poměrně úzkém rozmezí od 0,19 do 0,32 g⁻¹, ale v různých variantách se v průběhu sukcese lišila. Největší rozdíly ve vlhkosti půdy mezi plochami lze pozorovat u jetele. Nejvyšší vlhkosti bylo dosaženo na starších plochách v půdě s jetelem (S60) a v kontrolní půdě (R20, R60). Naopak nejnižší vlhkost byla zaznamenána na středně staré sukcesní ploše (S30) v půdě se štírovníkem a vikví v konkurenci s travou.

S rostoucím stářím ploch se vlhkost půdy s jetelem postupně zvyšovala, což je patrné zejména na sukcesních plochách (Obr. 8). Na nejstarší sukcesní ploše (S60) byla zjištěna vůbec nejvyšší hodnota půdní vlhkosti v celém experimentu (0,32 g⁻¹). Na rekultivovaných plochách je patrný lehký vzrůst vlhkosti na středně staré ploše (R20). Konkurence trávy vlhkost půdy s jetelem téměř neovlivnila, i když ji na většině ploch lehce zvýšila s výjimkou plochy S20, kde jí naopak výrazněji snížila.

Vlhkost půdy se štírovníkem ukázala oproti jiným variantám na všech plochách velmi podobné hodnoty, a žádný ze sledovaných faktorů ji významně neovlivnil. Na rekultivovaných plochách lze pozorovat mírný vzrůst a průběh vlhkosti na sukcesních plochách připomíná trend podobný nadzemní biomase štírovníku s píkem na ploše S30, který je zřetelnější v konkurenci s travou (Obr. 8). Konkurence trávy hodnoty vlhkosti půdy zejména na starších plochách (S30, S60, R60) snížila.

S rostoucím stářím ploch se vlhkost půdy s vikví spíše zvyšovala, a to zejména na rekultivovaných plochách, kde byla významně vyšší než na sukcesních plochách (Obr. 8). Konkurence trávy s vikví vlhkost půdy oproti jiným variantám spíše snížila, zejména na střední sukcesní ploše (S30).

S rostoucím stářím ploch vlhkost v kontrolní půdě vzrůstala (Obr. 8). Na rekultivovaných plochách byla půdní vlhkost významně vyšší než na sukcesních plochách. S výjimkou nejmladší rekultivované plochy (R15) je vlhkost půdy, ve které rostla tráva, mírně vyšší, než v holé půdě.



Obr. 8: Vlhkost půdy s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucích v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku. Výsledky T-testu mezi variantami s a bez kompetice – pokud je signifikantní ($p < 0,05$), je označen hvězdičkou.

4.4 Respirace půdy s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

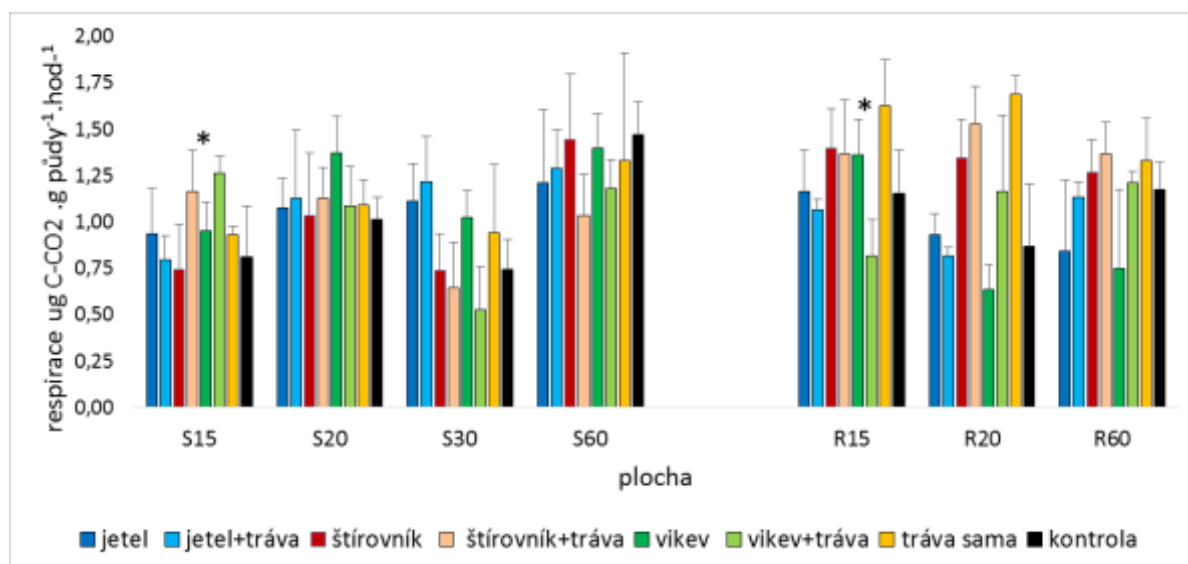
Výsledky GLM ukazují, že respirace půdy v řádné z variant nebyla statisticky významně ovlivněna věkem ploch. V půdě se štírovníkem a v kontrolní půdě se respirace půdy statisticky významně lišila mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. Respirace v kontrolní půdě byla navíc statisticky významně ovlivněna kompeticí resp. růstem trávy. V půdě s vikví se prokázala statisticky významná interakce kompetice a plochy. (Tab. 7).

Tab. 7: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na respiraci půdy s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------|---------|-----------------------|------------|------------------------------|
| respirace | | | | |
| jetel | 0.196 | 0.266 | 0.661 | 0.7679 |
| štírovník | 0.348 | 6.57e-05 *** | 0.575 | 0.1596 |
| vikev | 0.597 | 0.184 | 0.884 | 0.0001315 *** |
| kontrola | 0.07658 | 0.00508 ** | 0.00938 ** | 0.0639549 |

Při podrobnějším pohledu na výsledky respirace půdy (Obr. 9) vidíme, že se respirace půdy mezi variantami sice lišila, ale pohybovala celkově se v poměrně úzkém rozmezí od 0,5 do 1,6 $\mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g půdy}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$ a v žádné z variant se s rostoucím věkem významněji neměnila. Respirace půdy s jetelem na sukcesních plochách ukázala odlišný průběh než v ostatních variantách. Zatímco u jetele postupně mírně vzrůstá (řádově v desetinách $\mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g půdy}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$), u ostatních variant lze sledovat střídavé mírné kolísání hodnot (pokles v S15 a S30 a naopak vzrůst v S20 a S60). Na rekultivovaných plochách respirace půdy s růstem jetele a štírovníku bez konkurence trávy nepatrně klesá, zatímco v kontrolní půdě a půdě s vikví má tendenci na středně staré ploše (R20) klesat a zase stoupat. V půdě se štírovníkem se respirace ukázala být na sukcesních plochách významně nižší než na plochách rekultivovaných, a stejně tomu bylo i v kontrolní půdě.

Vliv růstu trávy na respiraci půdy s jetelem a štírovníkem nebyl významný, a více se projevil v půdě s vikví a v kontrolní půdě. Zatímco na nejmladší sukcesní ploše (S15) konkurence trávy s vikví respiraci zvýšila, na starších plochách ji dále spíše snižovala (Obr. 9). Na nejmladší rekultivované ploše (R15) tráva respiraci naopak snížila a na starších rekultivovaných plochách růst trávy respiraci dále zvyšoval, a její průběh je tak opačný oproti variantě bez konkurence trávy (Obr. 9). Přítomnost trávy s výjimkou nejstarší sukcesní plochy (S60) respiraci půdy zvýšila, a to zejména na rekultivovaných plochách, kde na plochách R15 a R20 respirace dosáhla nejvyšších hodnot v experimentu, a to kolem 1,6 $\mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g půdy}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$.



Obr. 9: Respirace půdy s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucími v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucími buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku. Výsledky T-testu mezi variantami s a bez kompetice – pokud je signifikantní ($p < 0,05$), je označen hvězdičkou.

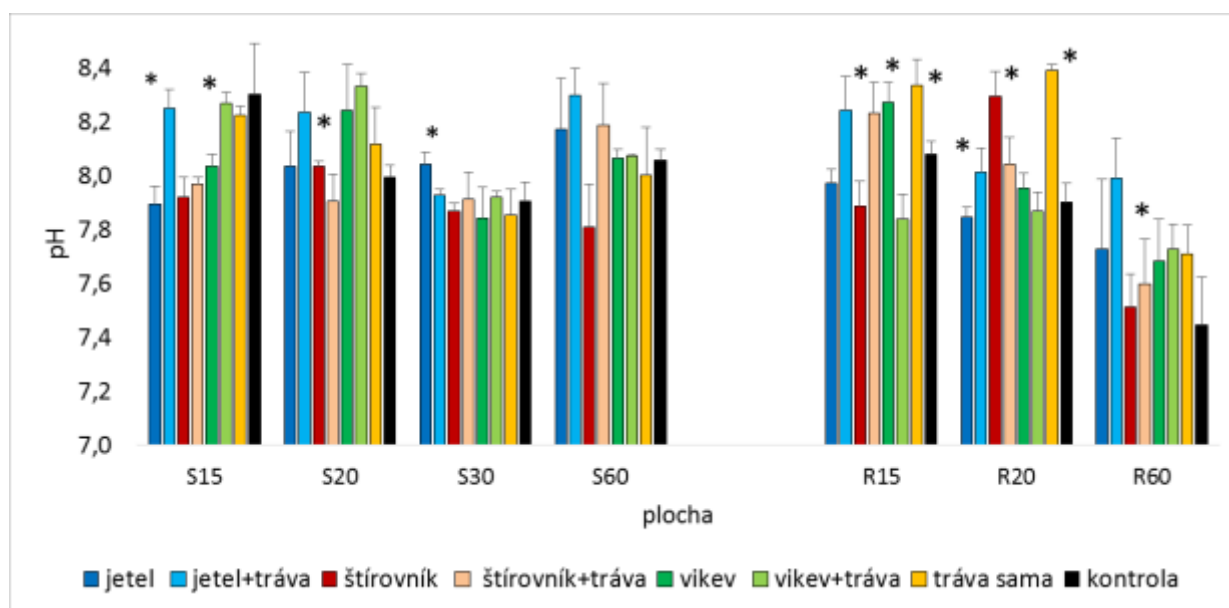
4.5 pH půdy s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Z výsledků GLM je patrné, že kromě půdy s jetelem bylo pH půdy statisticky ovlivněno věkem. V půdě s jetelem a vikví se pH statisticky významně lišilo mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. V půdě s jetelem měla na pH navíc statisticky významný vliv kompetice trávy, stejně tak přítomnost trávy signifikantně ovlivnila pH i v kontrolní půdě. Kromě půdy s jetelem se v ostatních půdách prokázal statisticky významný vliv kompetice a plochy (Tab. 8).

Tab. 8: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na pH půdy s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------|----------------|-----------------------|------------|------------------------------|
| pH | | | | |
| jetel | 0.83965 | 0.00179 ** | 0.01090 * | 0.315222 |
| štírovník | 0.000326 *** | 0.723456 | 0.199891 | 3.618e-05 *** |
| vikev | 0.000423 *** | 0.000100 *** | 0.841853 | 3.541e-06 *** |
| kontrola | 0.00000219 *** | 0.45721 | 0.00237 ** | 0.001013 ** |

Ze souhrnného grafu (Obr. 10) je zřejmé, že se pH celkově v rámci treatmentů nijak významně neměnilo a pohybovalo se v rozmezí hodnot 7,4 – 8,4; nejčastěji ale od 7,8 do 8,3. Ve všech variantách pH půdy s rostoucím stářím ploch mírně klesalo. Jinak tomu bylo v případě jetele, kde na sukcesních plochách pH naopak mírně vzrůstalo, ovšem na rekultivovaných plochách klesalo výrazněji, než v jiných variantách. Nejnížší hodnoty pH lze tak zaznamenat ve všech variantách na nejstarší rekultivované ploše (R60). Na sukcesních plochách bylo pH půdy ve všech variantách vždy vyšší než na plochách rekultivovaných, nejzřetelnější to bylo v půdě s jetelem a vikví. Konkurence trávy s výjimkou vikve pH půdy spíše zvýšila. Nejvýraznější vzrůst pH mezi rostlinami díky konkurenci trávy lze pozorovat v půdě s jetelem (Obr. 10), kde pH díky trávě vzrostlo na všech plochách s výjimkou plochy S30. Také v kontrolní půdě bylo pH půdy s trávou významně vyšší než v holé půdě, zejména na rekultivovaných plochách. V půdě se štírovníkem konkurence trávy zvýšila pH půdy výrazněji na dílčích plochách, sukcesních (S60) i rekultivovaných (R15, R60), naopak na některých (R20) ji snížila. Podobně konkurence trávy ovlivnila půdu s vikví, kdy na sukcesních plochách způsobila spíše mírný nárůst pH (S15, S20, S30) a na rekultivovaných spíše mírný pokles, zejména na nejmladší ploše (R15).



Obr. 10: pH půdy s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucích v rekultivovaných (R) a nerekulivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku. Výsledky T-testu mezi variantami s a bez kompetice – pokud je signifikantní ($p < 0,05$), je označen hvězdičkou.

4.6 Dostupný fosfor v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Výsledky GLM ukazují, že množství dostupného fosforu v půdě s vikvovitými rostlinami nebylo statisticky významně ovlivněno věkem ploch, ale signifikantní vliv ukázal v kontrolní půdě. Konkurence trávy dostupný fosfor statisticky významně ovlivnila jen v půdě s jetelem. Zde byl také signifikantní rozdíl dostupného fosforu v půdě mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. Stejně tak v kontrolní půdě se množství fosforu mezi těmito plochami statisticky významně lišilo. V půdě s vikví a v kontrolní půdě se prokázala signifikantní interakce konkurence a plochy (Tab. 9).

Tab. 9: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na množství dostupného fosforu v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------------|------------|-----------------------|-----------|------------------------------|
| dostupný fosfor | | | | |
| jetel | 0.20898 | 0.00738 ** | 0.01726 * | 0.09947 |
| štírovník | 0.796 | 0.922 | 0.630 | 0.6456645 |
| vikev | 0.16793 | 0.94012 | 0.55785 | 0.02603 * |
| kontrola | 0.025374 * | 0.013560 * | 0.226606 | 0.0079671 ** |

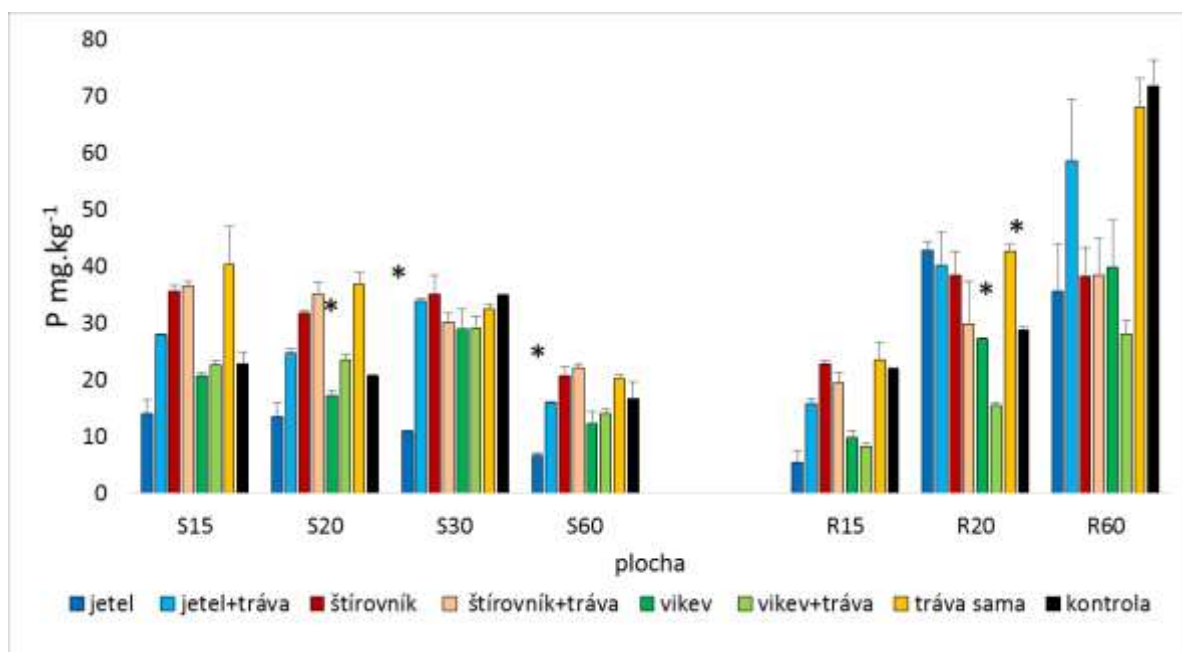
Při podrobnějším pohledu na výsledky fosforu (Obr. 11) je vidět, že se množství dostupného fosforu v půdě celkově pohybovalo v poměrně širokém rozmezí od 5 do 71 mg.kg⁻¹, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo na nejstarší rekultivované ploše (R60) v holé půdě a v půdě pouze s trávou. Obecně lze konstatovat, že s rostoucím stářím ploch obsah dostupného fosforu v půdě na sukcesních plochách spíše pozvolna klesal, zatímco na rekultivovaných plochách jeho množství naopak výrazně stoupalo. Lze si povšimnout, že ve všech variantách bylo nejméně fosforu na nejstarší sukcesní ploše (S60) a zároveň na nejmladší rekultivované ploše (R15), a zjištěné množství bylo na těchto plochách vždy srovnatelné. Na nejstarší rekultivované ploše (R60) bylo v půdách s vikvovitými rostlinami bez trávy naměřeno zhruba 2x méně dostupného fosforu než v kontrolní půdě.

Největších změn co do obsahu fosforu probíhalo v půdě s jetelem. Na sukcesních plochách u něj bylo množství dostupného fosforu výrazněji méně než v jiných variantách (Obr. 11), přičemž s rostoucím věkem se jeho množství ještě snižovalo až na řádově jednotky mg.kg⁻¹.

Na rekultivovaných plochách byl trend zcela opačný. Na iniciální ploše (R15) byla naměřeno nejméně fosforu v celém experimentu ($5,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a tedy srovnatelné množství jako na nejstarší sukcesní ploše (S60). S rostoucím věkem množství dostupného fosforu rapidně vzrůstalo, konkrétně až 7x na ploše R20. S konkurencí trávy bylo množství fosforu v půdě s jetelem významně vyšší, na sukcesních plochách asi 2x vyšší oproti variantě bez konkurence trávy, na ploše S30 dokonce 3x. Na rekultivovaných plochách to nebylo tolik výrazné a na středně staré rekultivované ploše (R20) přítomnost trávy množství fosforu naopak mírně snížila.

V půdě se štírovníkem byl obsah dostupného fosforu na různých plochách velmi podobný mezi sukcesními a rekultivovanými plochami se zásadně nelišil. Na sukcesních plochách bylo jeho množství podstatně vyšší než v půdě s jetelem (Obr. 11). S rostoucím věkem zde lze pozorovat mírný pokles a na rekultivovaných plochách naopak mírný vzrůst hodnot. Konkurence trávy množství dostupného fosforu v půdě v případě štírovníku téměř nezměnila, na rekultivovaných plochách jej mírně snížila.

Obsah dostupného fosforu v půdě s vikví a v kontrolní půdě ukázal podobný průběh, kdy na sukcesních plochách jeho množství mírně kolísalo s píkem na středně staré ploše (S30) a na rekultivovaných plochách naopak výrazně, více než 3x, stoupalo (Obr. 11). Zejména v kontrolní půdě byl nárůst rapidní a na nejstarší rekultivované ploše (R60) je hodnota $71,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vůbec nejvyšší, která byla v tomto experimentu naměřena. Konkurence trávy s vikví snížila množství dostupného fosforu na starších rekultivovaných plochách, naopak na mladších sukcesních plochách jej mírně zvýšila. Podobně i v kontrolní půdě růst samostatné trávy zvýšil obsah fosforu na mladších sukcesních plochách (S15, S20), stejně jako na střední rekultivované ploše (R20).



Obr. 11: Dostupný fosfor v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucích v rekultivovaných (R) a nereakultivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku. Výsledky T-testu mezi variantami s a bez kompetice – pokud je signifikantní ($p < 0,05$), je označen hvězdičkou.

4.7 Dostupné železo v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Výsledky GLM ukazují, že v žádné z variant se množství dostupného fosforu statisticky významně nelišilo mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. V kontrolní půdě neměl žádný z faktorů na obsah železa v půdě statisticky významný vliv. V půdě se štírovníkem a vikví se prokázal signifikantní vliv věku ploch. Konkurence trávy ze všech variant statisticky významně ovlivnila hodnoty dostupného železa pouze v půdě s jetelem, kde se také prokázala signifikantní interakce kompetice a plochy (Tab. 10).

Tab. 10: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na množství dostupného železa v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVY (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------|------------|--------------------------|-----------|---------------------------------|
| železo | | | | |
| jetel | 0.4242 | 0.2131 | 0.0163 * | 0.0489088 * |
| štírovník | 0.00415 ** | 0.33773 | 0.39257 | 0.091835 |
| vikev | 0.0373 * | 0.3873 | 0.0701 | 0.937222 |
| kontrola | 0.601 | 0.471 | 0.673 | 0.0813361 |

Ze získaných výsledků (Obr. 12) je vidět, že se množství dostupného železa v půdě pohybovaly od 200 do 470 mg.kg⁻¹. Lze konstatovat, že v rámci variant byl průběh hodnot obdobný, ovšem v půdě s vikví byl celkově obsah železa celkově o něco vyšší.

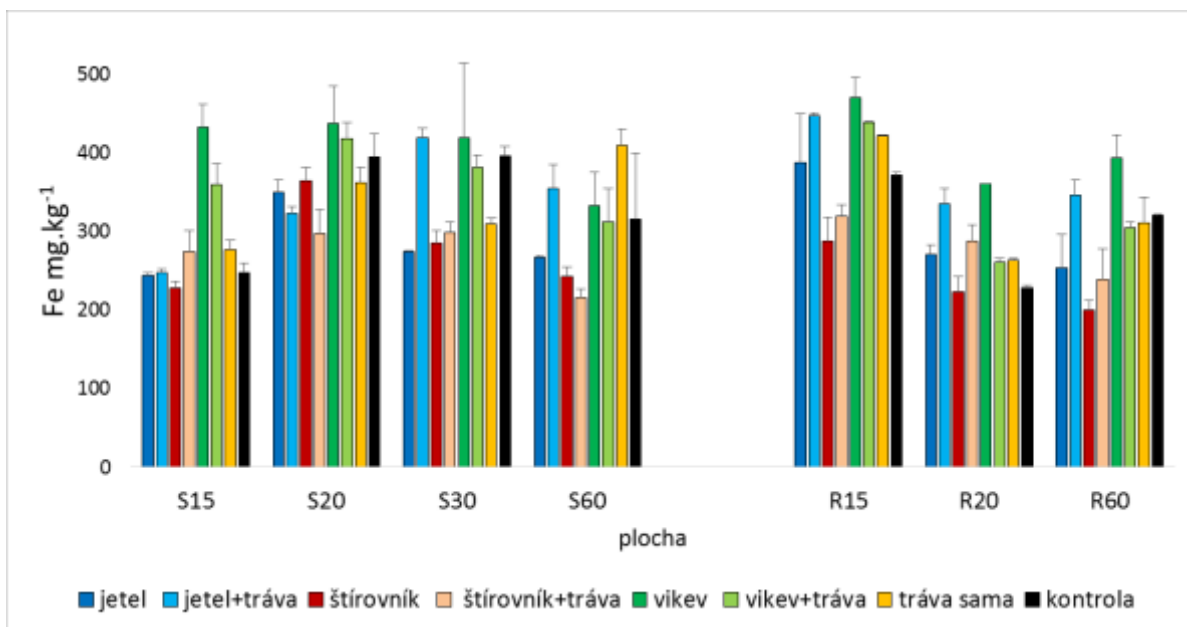
Mezi chronosekvencemi bylo množství železa v půdě s jetelem velmi podobné (Obr. 12). Větší rozdíly lze pozorovat na iniciálních plochách (S15, R15), kdy na nejmladší rekultivované ploše (R15) je nejvíce železa ze všech ploch s jetelem. Zatímco na sukcesních plochách se hodnoty železa s rostoucím věkem takřka neliší až na drobný pík na ploše S20, na rekultivovaných plochách dostupné železo s věkem ubývá. S konkurencí trávy je obsah železa v půdě s jetelem vyšší, zejména na rekultivovaných plochách. Také na starších sukcesních plochách (S30, S60) je s konkurencí obsah železa vyšší než bez ní, a v rámci sukcesních ploch jeho množství vzrůstá.

Obsah železa v půdě se štírovníkem má podobný průběh jako v půdě s jetelem, kdy na sukcesních plochách velmi mírně klesá s píkem na S20 a na rekultivovaných plochách klesá výrazněji (Obr. 12). Kompetice trávy se štírovníkem v půdě hodnoty celkového železa významně neovlivnila, ale na rekultivovaných plochách přispěla k jeho mírnému zvýšení.

S rostoucím stářím ploch se množství železa v půdě s vikví snižuje, a to u obou chronosekvencí, i když na rekultivovaných plochách je to o něco výraznější (Obr. 12). Na nejmladších plochách (S15, R15) je množství dostupného železa v půdě s vikví podstatně více než v jiných variantách. Konkurence trávy přispěla k poklesu hodnot, což se projevilo více na starších rekultivovaných plochách (S20, S60).

V holé půdě lze co do množství železa mezi chronosekvencemi pozorovat v podstatě opačný trend. Zatímco obsah železa na sukcesních plochách nejprve mírně rostl a ke stáří opět klesal, na rekultivovaných plochách bylo nejvíce železa naměřeno naopak na nejmladší ploše

(R15) (Obr. 12). Poté jeho množství prudce kleslo a na nejstarší ploše (R60) bylo opět vyšší. Přítomnost samotné trávy se obsahu železa v půdě projevila na různě starých plochách odlišně. Výrazněji je snížila na střední sukcesní ploše (S30) a naopak zvýšila na nejstarší sukcesní (S60) a mladších rekultivovaných plochách (R15, R20).



Obr. 12: Dostupné železo v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucích v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku.

4.8 Celkový organický uhlík (TOC) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Z výsledků GLM vyplývá, že celkové množství organického uhlíku v půdách ve všech variantách bylo statisticky významně ovlivněno věkem ploch a stejně tak se všude ukázal statisticky významný rozdíl mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. V půdě s jetelem měla na obsah uhlíku navíc signifikantní vliv konkurence trávy. Ve variantě s vikví se prokázala statisticky významná interakce kompetice a plochy (Tab. 11).

Tab. 11: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na množství celkového organického uhlíku (TOC) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------|--------------|-----------------------|------------|------------------------------|
| TOC | | | | |
| jetel | 2.54e-10 *** | 1.69e-06 *** | 0.024631 * | 0.277679 |
| štírovník | 3.66e-06 *** | 1.56e-09 *** | 0.924 | 0.06574 |
| vikev | 3.09e-05 *** | 5.22e-07 *** | 0.783 | 0.02198 * |
| kontrola | 1.65e-06 *** | 8.10e-07 *** | 0.288 | 0.8976 |

Na Obr. 13 je jednoznačně vidět, že se obsah celkového organického uhlíku ve všech variantách s rostoucím stářím ploch zvyšoval, a že jeho množství bylo vždy na sukcesních plochách nižší než na plochách rekultivovaných. Je také patrné, že na sukcesních plochách obsah uhlíku v půdě rostl pozvolněji než na plochách rekultivovaných. To je vidět při podrobnějším pohledu na zjištěné hodnoty uhlíku (Obr. 13) na srovnatelně starých plochách (S15 vs. S20; R15 vs. R20). Na ploše R20 bylo množství uhlíku ve všech variantách vždy minimálně 2,5 krát vyšší než na ploše S20. Celkově se tedy ve všech variantách ukázal podobný vývoj obsahu uhlíku, ale lišil se jeho obsah.

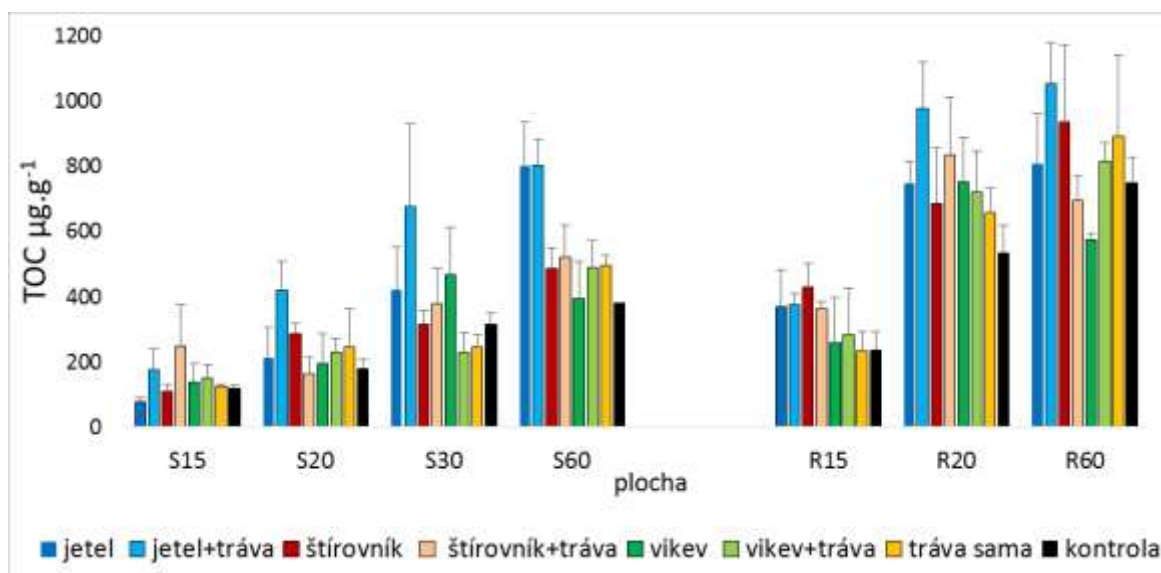
Největší množství uhlíku bylo zpozorováno v půdě s jetelem, kde s věkem také probíhal jeho největší nárůst, zejména na sukcesních plochách, a obsah uhlíku zde rostl značně rychleji než v holé půdě (Obr. 13). Na sukcesní ploše (S15) bylo uhlíku nejméně ze všech treatmentů ($77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ale rapidní nárůstem dosáhl obsah uhlíku v půdě na nejstarší sukcesní ploše (S60) mnohem vyšších hodnot, než v jiných variantách ($802 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Na rekultivovaných plochách bylo zpočátku uhlíku v půdě s jetelem více než na sukcesních, a jeho množství rostlo také rychleji. Zatímco množství uhlíku mezi plochami S20 a S60 se značně liší, mezi stejně starými plochami R20 a R60 je oproti tomu rozdíl minimální. Na nejstarších plochách (S60, R60) je ovšem množství uhlíku v půdě bez konkurence trávy takřka srovnatelné. Konkurence trávy s jetelem významně zvýšila hodnoty uhlíku v půdě téměř na všech plochách. Její vliv se ovšem neprojevil na nejstarší sukcesní ploše (S60) a zároveň na nejmladší rekultivované ploše (R15). V půdě s jetelem a konkurencí trávy na ploše R60 bylo uhlíku nejvíce z celého experimentu ($1054 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

V půdě se štírovníkem byl rozdíl v množství uhlíku mezi sukcesními a rekultivovanými plochami výraznější než v půdě s jetelem. Už na iniciálních plochách (S15 vs. R15) se jeho

množství značně lišilo (ve variantě bez trávy až čtyřnásobně) a pozvolný růst obsahu uhlíku na sukcesních plochách nedosáhl zdaleka na hodnoty naměřené na rekultivovaných plochách (Obr. 13). Obsah organického uhlíku na nejstarší sukcesní ploše (S60) je dokonce téměř srovnatelný s jeho množstvím na iniciální rekultivované ploše (R15). Množství uhlíku v půdě se štírovníkem na rekultivovaných plochách je naopak srovnatelné jako v půdě s jetelem. Konkurence trávy se štírovníkem neměla na obsah uhlíku celkově významný vliv, projevila se na jednotlivých plochách odlišně. Výrazněji zvýšila množství uhlíku na nejmladší sukcesní ploše (S15) a na nejstarší rekultivované ploše (R60).

Množství uhlíku v půdě s vikví bylo na sukcesních plochách méně jak na iniciálních tak na starších plochách než na plochách rekultivovaných a lze říci, že srovnatelné jako v půdě se štírovníkem s výjimkou plochy R15, kde je uhlíku v půdě s vikví méně (Obr. 13). S konkurencí trávy se obsah uhlíku v půdě s vikví celkově příliš nelišil, projevila se ale na dílčích plochách. Na střední sukcesní ploše (S30) způsobila pokles hodnot. Na nejstarších plochách (S60, R60) naopak s konkurencí trávy obsah uhlíku v půdě vzrostl.

Průběh obsahu uhlíku v holé půdě byl stejný jako v půdě pouze s trávou (Obr. 13). Na sukcesních plochách byly jejich hodnoty obdobné těm v půdě se štírovníkem a vikví. Na sukcesních plochách množství uhlíku rostlo pomaleji a celkově ho bylo v půdě zhruba dvakrát méně než na rekultivovaných plochách. Tento rozdíl projevil nejvíce na středně starých plochách bez přítomnosti trávy v půdě (S20, R20), kde byl rozdíl až trojnásobný. Růst trávy v půdě celkově na obsah uhlíku v půdě neměl zásadní vliv. Stejně jako u vikve přítomnost trávy ale způsobila vzrůst uhlíku na nejstarších plochách (S60, R60).



Obr. 13: Celkový organický uhlík (TOC) půdě s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucích v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku.

4.9 Celkový dusík (TN) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou *Poa compressa* v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Z výsledků GLM vyplývá, že celkové množství dusíku v půdách ve všech variantách bylo statisticky významně ovlivněno věkem ploch a stejně tak se všude ukázal statisticky významný rozdíl mezi sukcesními a rekultivovanými plochami. Konkurence trávy v žádné z variant hodnoty dusíku v půdě statisticky významně neovlivnila. Ve variantě s vikví se ale prokázala statisticky významná interakce kompetice a plochy (Tab. 12).

Tab. 12: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na množství celkového dusíku (TN) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy. Signifikantní výsledky jsou zvýrazněny červeně ($p < 0,05$).

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------|--------------|-----------------------|-----------|------------------------------|
| TN | | | | |
| jetel | 6.98e-08 *** | 1.25e-06 *** | 0.233 | 0.1455 |
| štírovník | 5.65e-09 *** | 2.83e-07 *** | 0.766 | 0.06667 |
| vikev | 0.00304 ** | 1.58e-06 *** | 0.97378 | 0.000329 *** |
| kontrola | 9.60e-06 *** | 8.42e-06 *** | 0.118944 | 0.24826 |

Z výsledků celkového dusíku (Obr. 14) je zřejmé, že rostoucím věkem množství dusíku v půdě ve všech variantách rostlo a významně se lišilo mezi chronosekvencemi, kdy na sukcesních plochách bylo celkově dusíku méně než na plochách rekultivovaných. Na rekultivovaných plochách také rostlo množství dusíku rychleji než na sukcesních plochách. Na iniciální sukcesní ploše (S15) je jak ve variantách s vikovitými (kromě varianty se štírovníkem s travou) tak v holé půdě zhruba dvakrát až třikrát méně dusíku než na iniciální rekultivované ploše (R15), v kontrolní půdě pouze s travou je rozdíl až pětinasobný. Toto množství je mezi variantami podobné, ale na starších plochách se mezi variantami objevují rozdíly.

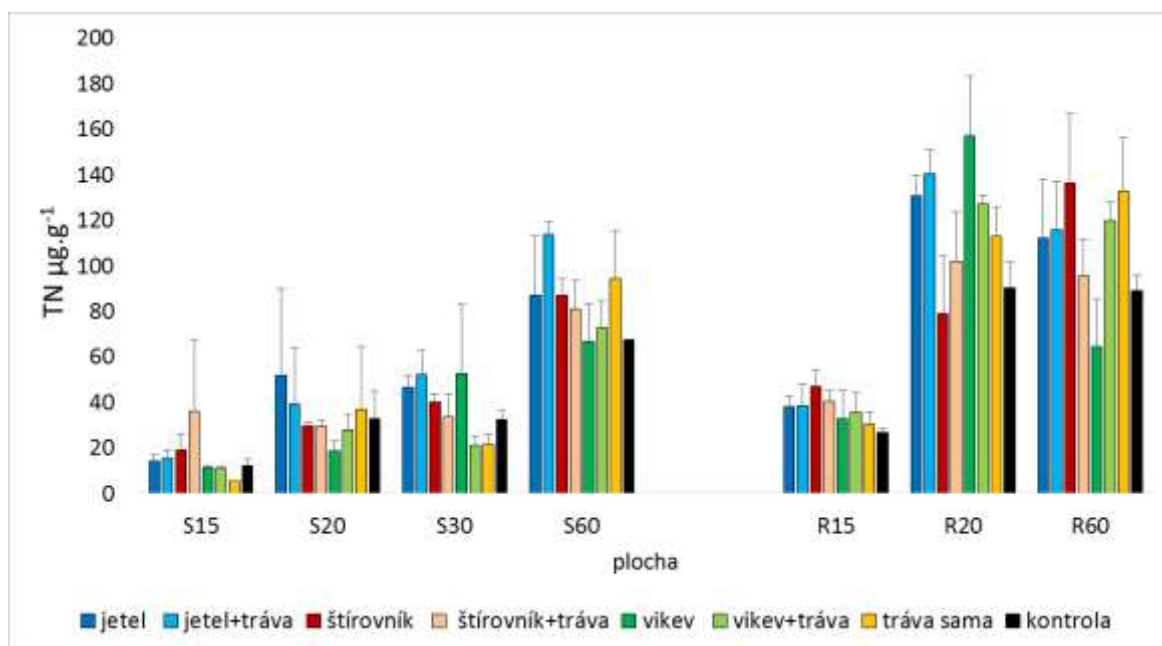
V půdě s jetelem lze pozorovat výrazný nárůst dusíku mezi nejmladšími a středně starými plochami (S15 vs. S20, R15 vs. R20), kde je více jak trojnásobný rozdíl (Obr. 14). Zatímco na sukcesních plochách jeho množství dále roste, na nejstarší rekultivované ploše (R60) je patrný naopak pokles dusíku. I když na sukcesních plochách roste množství dusíku v půdě pozvolněji, na nejstarších plochách (S60, R60) se ovšem obsah dusíku tak výrazně neliší a ve variantách konkurence s travou je dokonce stejný. V podmínkách konkurence trávy s jetelem nebyl na iniciálních plochách (S15, R15) patrný rozdíl, ovšem na starších plochách (S30, S60, R20, R60) bylo dusíku s konkurencí trávy v půdě o něco málo více.

Na rozdíl od jiných variant bylo dusíku v půdě se štírovníkem na nestarší rekultivované ploše (R60) ještě o něco více než na střední rekultivované ploše (R20). I když obsah dusíku na sukcesních plochách rostl, stejně jako v ostatních variantách, pozvolněji, na nejstarších plochách (S60, R60) bylo jeho množství ve variantách s travou srovnatelné (Obr. 14). Společný růst trávy se štírovníkem celkový obsah dusíku v půdě významně neovlivnil, i když se projevil spíše na dílčích plochách. Na iniciální sukcesní (S15) a středně staré rekultivované ploše (R20) lze s konkurencí trávy pozorovat nárůst dusíku, na nejstarších plochách (S60, R60) naopak pokles.

V půdě s vikví bylo na sukcesních plochách dusíku v půdě méně než v půdě s jetelem a štírovníkem, zřejmě kvůli malému růstu vikve. Na rekultivovaných plochách lze ale pozorovat rapidní nárůst obsahu dusíku mezi plochami R15 a R20, kde je výrazný pík (Obr. 14). Dále množství dusíku klesá a na nejstarší rekultivované ploše (R60) je již jeho obsah srovnatelný s hodnotou naměřenou na nejstarší sukcesní ploše (S60). Konkurence trávy se projevila spíše na starších plochách. Zatímco na středně starých plochách (S30, R20) způsobila konkurence pokles dusíku, na nejstarších (S60, R60) naopak jeho vzrůst.

Množství dusíku v holé půdě a půdě s travou na iniciální sukcesní ploše (S15) bylo velmi nízké a nejnižší v celém experimentu ($5,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), ale s věkem významně rostlo (Obr. 14). Růst

trávy v půdě způsobil na nejstarších plochách (S60, R60) vyšší obsah dusíku oproti holé půdě, a dosahuje podobných hodnot jako s vikvovitými rostlinami.



Obr. 14: Celkový dusík (TN) půdě s vikvovitými rostlinami a trávou rostoucích v rekultivovaných (R) a nerekulitovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s trávou. Úsečky značí směrodatnou odchylku.

4.10 Poměr obsahu uhlíku a dusíku (C:N) v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou

Poa compressa v různých sukcesních stádiích s a bez kompetice

Z výsledků GLM je zřejmé, že C:N poměr byl kromě půdy s jetelem statisticky významně ovlivněn věkem ploch. V půdě s vikví a v kontrolní půdě se C:N statisticky významně lišilo mezi rekultivovanými a sukcesními plochami. V žádné z variant neměla konkurence trávy na C:N signifikantní vliv. Kromě varianty s vikví se ale prokázal statisticky významný vliv interakce kompetice a plochy (Tab. 13).

Tab. 13: Výsledky generálních lineárních modelů (GLM) posuzující vliv věku ploch, způsobu jejich rekultivace (rekultivace vs. spontánní sukcese) a kompetice s trávou na C:N poměr v půdě s vikvovitými rostlinami a trávou bez kompetice – kontrola. Výsledky dvoucestné ANOVy (two-way ANOVA) testující interakci konkurence a plochy.

| | věk | sukcese X rekultivace | kompetice | interakce (kompetice:plocha) |
|-----------|-----------|-----------------------|-----------|------------------------------|
| C:N | | | | |
| jetel | 0.9236 | 0.6231 | 0.0934 | 0.0250850 * |
| štírovník | 0.0171 * | 0.2424 | 0.4005 | 0.004523 ** |
| vikev | 0.04943 * | 0.00179 ** | 0.66904 | 0.6445 |
| kontrola | 0.0472 * | 0.0528 | 0.1838 | 0.001866 ** |

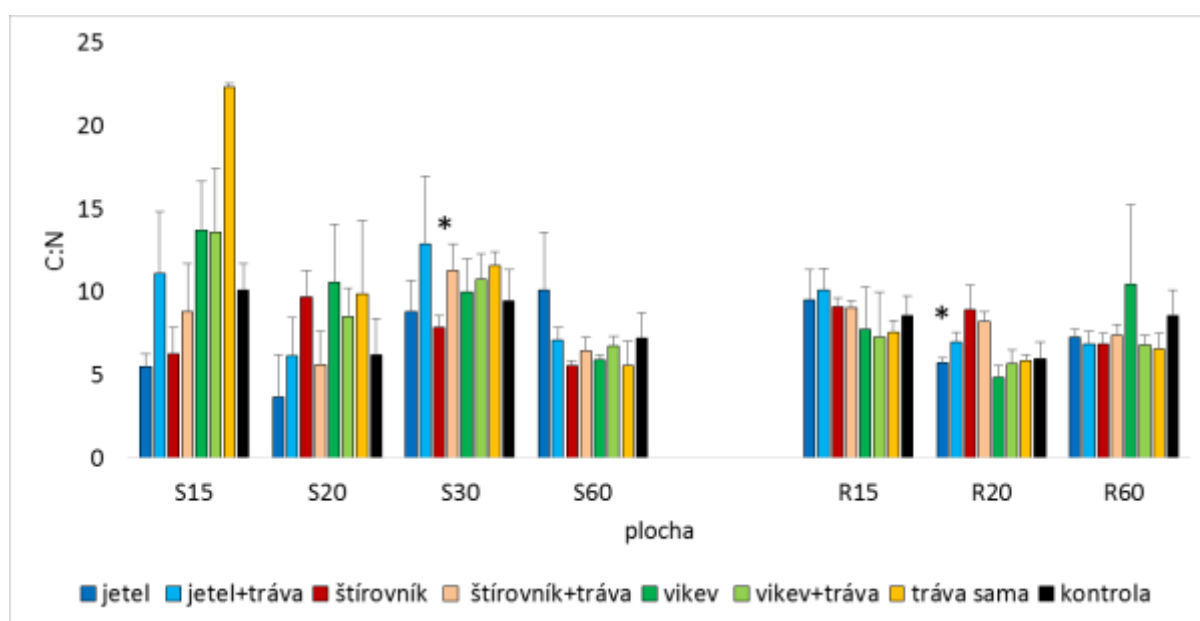
Při podrobnějším zhodnocení je vidět (Obr. 15), že C:N poměr ukazuje ve všech variantách se společným růstem trávy podobný trend, který na sukcesních plochách charakterizuje střídavé kolísání hodnot s píky (S15 a S30) a poklesy (S20 a S60). Na rekultivovaných plochách tento trend ukazuje pokles hodnot na středně staré ploše (R20). Na rekultivovaných plochách se tedy C:N poměr celkově hýbe méně než na sukcesních plochách. C:N poměr se mezi půdami s vikvovitými rostlinami bez konkurence trávy stejně jako v holé půdě liší.

C:N v půdě s jetelem bez konkurence trávy na sukcesních plochách rostl, zatímco na rekultivovaných plochách spíše klesal (Obr. 15). Na nejmladší sukcesní ploše (S15) je hodnota C:N = 6, a tedy podobné tomu na nejstarší rekultivované ploše (R60), kde C:N = 7. Naopak na nejstarší sukcesní ploše (S60) je C:N poměr stejný jako na nejmladší rekultivované ploše (R15), kde C:N = 10. Mezi sukcesními a rekultivovanými plochami se celkově C:N v půdě s jetelem významně nelišilo. Konkurence trávy výrazně přispěla k vyššímu C:N poměru kromě nejstarších ploch (S60, R60).

Na sukcesních plochách v půdě se štírovníkem bez konkurence trávy C:N poměr zpočátku lehce vzrostl a poté se opět snižoval (Obr. 15). Na rekultivovaných plochách se velmi nepatrně snižoval. Hodnoty na obou typech ploch se mezi sebou zásadně neliší. S konkurencí trávy C:N půdy na sukcesních plochách vzrostlo, kromě plochy S20, kde naopak s trávou kleslo. Na rekultivovaných plochách tráva na C:N půdy v podstatě vliv neměla.

V půdě s vikví byl C:N poměr výrazně vyšší na sukcesních než na rekultivovaných plochách (Obr. 15). Zatímco na sukcesních plochách postupně klesal, na těch rekultivovaných lze zaznamenat pokles na středně staré ploše (R20). S konkurencí trávy byly hodnoty C:N v půdě s vikví někde spíše nižší (S20, R15, R60) a jinde spíše vyšší (S30, R20).

C:N v holé půdě podobný trend jako v půdě se samostatnou travou, tedy na sukcesních plochách se střídavým kolísáním s píky (S15, S30) a poklesy (S20, S60), a na rekultivovaných plochách s mírným propadem na středně staré ploše (R20). Hodnoty na sukcesních plochách jsou celkově vyšší než na rekultivovaných plochách (Obr. 15). Samotná přítomnost trávy v půdě na sukcesních plochách zvýšila C:N půdy, a to zásadním způsobem na nejmladší ploše (S15), kde C:N = 22. Naopak na nejstarší sukcesní ploše (S60) je C:N v půdě s travou nižší. Stejně tak růst trávy snížil C:N půdy na rekultivovaných plochách.



Obr. 15: C:N poměr v půdě s vikvovitými rostlinami a travou rostoucích v rekultivovaných (R) a nerektivovaných – sukcesních (S) půdách různého stáří (věk ploch je vyznačen číslem za písmenem R nebo S), rostoucích buď bez kompetice, nebo v kompetici s travou. Úsečky značí směrodatnou odchylku. Výsledky T-testu mezi variantami s a bez kompetice – pokud je signifikantní ($p < 0,05$), je označen hvězdičkou.

5. Diskuze

5.1 Růst vikvovitých rostlin bez konkurence trávy během sukcese

Výsledky ukazují, že růst jetele a štirovníku bez konkurence trávy se zvyšoval se sukcesním stářím ploch (Tab. 3, Obr. 5), což potvrzuje prvotní hypotézu o růstu vikvovitých rostlin bez konkurence trávy (2). Jetel rostl celkově o něco rychleji než štirovník, jen na nejmladší sukcesní ploše (S15) byl růst srovnatelný (Obr. 5). Za vysokým růstem jetele pravděpodobně stojí jeho vysoká efektivita fixace dusíku, kdy navíc téměř veškerý dusík ke svému růstu přijímá prostřednictvím fixace, a to 80 % (Huss-Danell et al., 2007) ale i více jak 90 % (Dhamala et al., 2018). Důvodem zvyšujícího se růstu jetele a štirovníku během sukcese jsou zlepšující se podmínky v půdě. Z výsledků je zřejmé, že během sukcese se na plochách zlepšovala půdní vlhkost (Obr. 8), klesalo pH půdy (Tab. 8, Obr. 10) a současně s tím se zvyšovala dostupnost fosforu (Tab. 9, Obr. 11) a půda se tak stávala příznivější pro růst rostlin. Zvláště rostoucí množství dostupného množství fosforu zřejmě pozitivně ovlivnilo růst vikvovitých rostlin, protože proces symbiotické fixace dusíku vyžaduje vyšší zásobení fosforem než běžný růst rostlin, a snížená dostupnost fosforu omezuje proces symbiotické fixace, a tím růst vikvovitých rostlin (Rotaru a Sinclair 2008; Valentine et al. 2017).

Naproti tomu semena vikve ve většině případů ani nevyklíčila, růst několika vzrostlých rostlin byl nízký a během sukcese se neměnil (spontánní sukcese) nebo dokonce klesal (rekultivace) (Tab. 3, Obr. 5). Na řadě vzrostlých rostlin vikve v průběhu experimentu objevila chloróza, která mohla být důsledkem nízkého zásobení některého z prvků. Z mých výsledků vyplývá, že zkoumané výsypkové substráty obsahují velmi nízká množství dostupného fosforu. Chloróza tedy mohla vzniknout v reakci na nízký obsah dusíku vlivem limitace fixace dusíku fosforem, nebo přímo jako reakce na nízkou dostupnost fosforu, nebo i jiného prvku, který nebyl v této práci stanovován. Rozdíly v růstu tří sledovaných druhů vikvovitých rostlin odráží jejich odlišnou citlivost na podmínky v půdě a různé faktory omezující proces fixace dusíku (Zahran, 1991; Keyser et al., 1993).

Růst rostlin pod zemí odrážel nadzemní růst, kdy se růst kořenů během sukcese zvyšoval a v případě jetele a štirovníku rostly kořeny více na rekultivovaných plochách než na sukcesních (Tab. 5, Obr. 7). Na nejmladší sukcesní ploše (S15) byla biomasa kořenů jetele i štirovníku srovnatelná, stejně jako nadzemní biomasa (Obr. 7). Na všech dalších plochách je biomasa kořenů štirovníku vždy vyšší než jetele, i když je nadzemní růst jetele vyšší (Obr. 5, Obr. 7). To dokládá vztah mezi rozvojem kořenů a fixací dusíku. Změny ve způsobu získávání dusíku se u vikvovitých rostlin projevují právě v biomase kořenů. Se zvýšeným příjmem minerálního dusíku z půdy dochází k růstu

biomasy kořenů oproti příjmu pouze ze symbiotické fixace, kdy je růst kořenů nižší (Voisin et al., 2002). Zdá se tedy, že jetel ve srovnání se štírovníkem investoval méně energie do rozvoje kořenů, ale jeho růst byl více podpořen fixací dusíku, a proto byla jeho nadzemní biomasa vyšší než štírovníku. Vysokou míru fixace dobře odráží snížená dostupnost fosforu v půdě s jetelem oproti kontrolní půdě (Obr. 11), která dokládá vyšší spotřebu fosforu pro proces fixace dusíku jetele. Naopak biomasa kořenů štírovníku byla na mladších plochách dokonce vyšší než jeho nadzemní biomasa, což by mohlo poukazovat na vyšší čerpání dusíku z půdy a naopak nižší zisk dusíku ze symbiotické fixace.

I když se růst jetele a štírovníku s věkem zvyšoval, růst nebyl lineární. V rámci rekultivovaných ploch je zřejmý pokles růstu na ploše R20 (Obr. 5). Rostliny na této ploše více rozvíjely kořenový systém oproti nadzemní biomase (Obr. 5, Obr. 7). Zároveň je vzhledem k celkovému dusíku (Obr. 14) vidět, že v půdě s jetelem je zvýšený obsah dusíku oproti kontrolní půdě. To by mohlo poukazovat na vyšší rozvoj kořenů a příjem dusíku z půdy, a zvýšený podíl dusíkatých látek v exudátech na úkor fixace dusíku pro svůj vlastní růst. Vyšší uvolňování exudátů se mohlo projevit na zvýšení celkového uhlíku v půdě oproti kontrolní půdě (Obr. 13). Z celkového množství dusíku mohl být v této střední fázi sukcese ale jen malý podíl dostupného dusíku kvůli jeho imobilizaci mikroorganismy, které dusík více využívaly pro svůj růst. Mikrobiální kompetice o přidaný dusík do půdy byla zaznamenána zejména na málo úrodných loukách, kde se přidaný dusík ukládal přednostně do mikrobiální biomasy (Bardgett et al., 2003). Proto mohl být vzhledem k příjmu dusíku z půdy růst rostlin snížen.

V rámci sukcesních ploch lze u obou rostlin pozorovat pokles růstu na nejstarší sukcesní ploše (S60) (Obr. 5), kde jetel i štírovník rostly stejně rychle, jako na výše zmíněné rekultivované ploše (R20). Důvod tohoto poklesu by mohl být podobný, protože množství celkového uhlíku v půdě s jetelem a štírovníkem je taktéž vyšší než v kontrolní půdě (Obr. 13) a stejně tak množství celkového půdního dusíku (Obr. 14).

5.2 Růst vikvovitých rostlin s konkurencí trávy během sukcese

Na nejmladších sukcesních plochách (S15, R15) rostly vikvovité rostliny s konkurencí trávy srovnatelně jako bez konkurence (Obr. 5). S rostoucím věkem ploch se ale jejich růst v konkurenci s trávou snižoval (Tab. 3) a potvrdila se tak hypotéza (4). S rostoucím věkem se zvyšoval růst trávy a docházelo ke konkurenci o živiny v půdě, zejména o dusík, o který jsou trávy velmi silní konkurenti (Høgh -Jensen a Schjoerring, 1997; Gylfadottir et al., 2007; Rasmussen et al., 2007). Nicméně i přes obohacení půdy symbioticky vázaným dusíkem byla dostupnost dusíku

v půdě stále nízká, a dovolila vikvovitým rostlinám kompetičně přerůst travu. K podobným závěrům dospěli i Schwinning a Parsons (1996) a Thornley (2001). Růst vikve nebyl oproti jeteli a štírovníku příjmem dusíku ze symbiotické natolik zvýhodněn, zatímco na sukcesních plochách byla biomasa vikve srovnatelná při konkurenci a bez ní, na rekultivovaných plochách byl její růst potlačen přítomností trávy (Obr. 5). To je v rozporu s většinou studií, které poukazují na zvýhodnění vikvovitých rostlin v primární sukcesi (př. Graham a Vance, 2003; Temperton et al., 2007; Walker a del Moral, 2011). Příčinou bude povaha výsypkového substrátu, ve kterém vikve nebyla schopna vyklíčit a její růst byl omezen i na sukcesních plochách bez ohledu na konkurenci trávy. Studie také pracují s jinými druhy vikvovitých rostlin než vikví, a rozdílná míra fixace dusíku a schopnost konkurence se mezi druhy liší (Möllerová, 2006).

Konkurence trávy s vikvovitými rostlinami se projevila i v podzemní biomase ale při růstu s jetelem a štírovníkem, ale celkově tráva biomasu kořenů významně neovlivnila (Tab. 5). Biomasa společných kořenů jetele a trávy byla na většině ploch nižší než jen biomasa kořenů jetele bez konkurence, což odráží nízký růst trávy s jetelem. Množství kořenů štírovníku a trávy v konkurenci je celkově vyšší než v případě jetele a je výsledkem vyšší investice štírovníku do podzemní biomasy a většího růstu trávy než s jetelem (Obr. 7) a dokládá dále zřejmě vyšší přenos dusíku ze štírovníku do trávy, který je podle Paynel et al. (2008) spojen s větším růstem kořenů. Konkurence trávy s vikví zvýšila celkovou biomasu kořenů a s věkem její vliv rostl (Obr. 7). Na starších plochách bylo toto množství kořenů srovnatelné jako v případě jetele a štírovníku s travou, i když nadzemní biomasa obou rostlin byla vyšší než trávy v konkurenci s vikví. To ukazuje na vyšší investici trávy do podzemní biomasy oproti nadzemnímu růstu a je v souladu s dřívějšími pracemi se společným růstem vikvovitých rostlin a trav, které došly k závěru, že vikvovité rostliny věnují oproti travám více energie do nadzemní biomasy a naopak méně do kořenového systému (Körner et al., 2008; Rastetter et al., 2001; Poorter et al., 2015). Stejně tak je tomu při samostatném růstu trávy (Obr. 7).

5.3 Vliv vikvovitých rostlin na růst trávy během sukcese

Růst trávy v konkurenci s vikvovitými rostlinami byl dle očekávání nižší, než když tráva rostla sama (Obr. 6) což se shoduje se studiemi (Butler a Lad, 1985; Beschow et al., 2000; McElroy et al., 2017), které také zaznamenali, že tráva při společném růstu s vikvovitou rostlinou měla jak snížený růst tak ale zároveň zlepšené zásobení dusíkem. Symbioticky fixovaný dusík se zásadním způsobem podílí na výživě trav rostoucí v blízkosti vikvovitých rostlin, a přímý přenos dusíku do trav byl široce zkoumán (př. Jefferies et al, 1981; Beschow et al., 2000; Paynel et al., 2001;

Pirhofer-Walzl et al., 2012; Rasmussen et al., 2013). Tráva si s vikvovitými rostlinami tedy konkurovala o půdní dusík, jehož množství bylo i přes přísun vikvovitými rostlinami nízké, aby uspokojilo nároky trávy. Růst trav mohl být kromě dusíku také potlačen sníženou dostupností světla, která je při sukcesi rostlin častá (Schwinning a Parsons, 1996; Thornley, 2001). Vzhledem k malé velikosti květináčku dále nemusela mít tráva možnost dostatečně rozvinout kořeny a využít tak prostoru půdy, o čemž se zmiňuje i Poorter et al. (2012).

Vzhledem k velmi omezenému růstu vikve ke zmíněným interakcím nedocházelo a tráva v konkurenci s vikví rostla podobně rychle jako bez konkurence (Obr. 6). Reagovala tedy pouze na zvyšující se dostupnost živin a příznivější podmínky půdy, ale zároveň nebyla omezena růstem vikvovité rostliny a nedocházelo ke konkurenci. Jen na nejstarší rekultivované plochy (R60), kde je biomasa samostatné trávy významně vyšší. Celkově byl tak růst trávy v konkurenci s vikví rychlejší než růst vikve.

Během sukcese se v půdě akumuloval dusík (Tab. 12, Obr. 14), k čemuž významným způsobem přispěla fixace dusíku vikvovitými rostlinami. Tráva mohla přijímat jak dusík z fixace vikvovitých rostlin, tak půdní dusík. Proto na starších plochách (plochy S60, R20, 260) rostla tráva rychleji (Tab. 3, Obr. 6). Během sukcese tedy rostl vliv konkurence trávy, což potvrzuje hypotézu o růstu trávy v konkurenci vikvovitých rostlin (3). Jak zaznamenaly studie společného růstu vikvovitých rostlin a trav (Høgh-Jensen a Schjoerring, 1997; Elgersma et al. 2000; Paynel et al. 2008), po přidání dusíku do půdy z jiného zdroje získávaly trávy více dusíku z vikvovitých rostlin i přes to, že podíl dusíku z fixace v biomase vikvovitých rostlin klesl.

Růst trávy bez konkurence i s konkurencí se celkově s věkem ploch zvyšoval, a podobně jako vikvovité rostliny byl rychlejší na rekultivovaných plochách než na plochách vyvíjejících se spontánní sukcesí (Tab. 3, Obr. 6). V konkurenci se štírovníkem rostla tráva celkově rychleji než v konkurenci s jetelem. Růst štírovníku i bez konkurence byl v porovnání s jetelem nižší (Obr. 5). Pravděpodobně nedocházelo tedy k tak významnému kompetičnímu vyloučení trávy ze strany štírovníku jako v případě jetele. Také by se zde mohla projevit odlišná druhová strategie rostlin, kdy některé vikvovité rostliny zadržují více získaného dusíku v rostlině a uvolňují dusíku rhizodepozicí, a jiné druhy přesouvají okolním rostlinám dusíku více (Pirhofer-Walzl et al., 2012).

5.4 Rozdíly růstu vikvovitých rostlin na rekultivovaných plochách a plochách vyvíjejících se spontánní sukcesí

V souladu s hypotézou (5) z výsledků vyplývá, že sledované vikvovité rostliny rostly rychleji na rekultivovaných plochách než na plochách vyvíjejících se spontánní sukcesí (Tab. 3, Obr. 5). Rozdíly byly největší na nejmladších plochách, s věkem se ale růst rostlin se s věkem ploch vyrovnával. Důvodem jsou rozdílné vlastnosti a vývoj půd během spontánní sukcese oproti cílené rekultivaci, které lze pozorovat ve výsledných hodnotách parametrů v kontrolní půdě. Rekultivované plochy byly významně ovlivněny porostem olší, kterými byly při rekultivaci nasázeny. Olše obohatily půdu symbioticky vázaným dusíkem a umožnily tím rychlejšímu rozvoji vegetace (Millett et al., 2011), a proto rekultivovaných plochách docházelo k rychlejšímu hromadění organické hmoty. Opad z listů olší je bohatý na obsah dusíku a má nižší C:N poměr než jiné rostliny (Binkley et al., 2005). To podporuje snadnější mikrobiální rozklad a tím rychlejší obrat živin, což mělo pozitivní vliv na růst rostlin.

Na rekultivovaných plochách díky tomu docházelo k rychlejšímu zpětnému zpřístupňování fosforu (Tab. 9, Obr. 11), jak potvrzují další práce (Binkley et al., 2005) a vyšší dostupnost fosforu byla celkově podmíněna nižším pH (Obr. 10) oproti sukcesním plochám.

Rychlejší obrat živin také dokládají hodnoty poměru C:N, který je na rekultivovaných plochách nižší (Tab. 13, Obr. 15), a dále vyšší respirace půdy (Tab. 7, Obr. 9) ve srovnání se sukcesními plochami. Rychlejší růst mikrobiální aktivity na rekultivovaných plochách oproti plochám vyvíjejících se spontánní sukcesí na výsypkách dokládá Helingerová et al. (2010). Nižší C:N poměr v půdě po rekultivaci odráží snadnější rozklad organických látek bohatých na dusík z listů olší. Lepší schopnost zadržení vody na plochách po rekultivaci (Obr. 8) kvůli vyššímu obsahu organické hmoty také mohla přispět k lepšímu vývoji kořenů a růstu rostlin (Six et al.; 2004).

Na sníženém růstu vikvovitých rostlin se mohlo podílet i nižší množství dusíku na sukcesních plochách ve srovnání s plochami rekultivovanými (Tab. 12, Obr. 14). Zejména na nejmladší sukcesní ploše bylo dusíku velice málo. I když vikvovité rostliny přijímají většinu dusíku skrze symbiotickou fixaci vzdušného dusíku, potřebují také určité množství půdního dusíku, a to zejména na počátku svého růstu (Sprent a Sprent, 1990). Vzhledem k tomu, že míra dostupných forem dusíku v půdě je obecně nízká a pohybuje se od 1 do 5 % (Bednarek a Tkaczyk 2002), lze uvažovat, že růst vikvovitých rostlin mohl být na mladších sukcesních plochách (S15, R15) snížen i velmi nízkou koncentrací dostupného dusíku v půdě.

Ze studie Sheoran et al, (2008) na výsypkách je také známo, že čerstvé výsypkové substráty často postrádají přirozené populace rhizobií, a obecně v raných fázích sukcese může docházet k nedostatku kompatibilních rhizobií, které by vytvořily vztah s konkrétním druhem vikkovitých rostlin (Weaver et al., 1971). Lze tedy uvažovat, že i tento efekt se mohl skrze omezené fixaci dusíku podílet na sníženém růstu vikkovitých rostlin na nejmladší sukcesní ploše (S15).

5.5 Vliv růstu vikkovitých rostlin na vlastnosti půdy

Během sukcese významně vzrůstal celkový obsah dusíku v půdě, a to jak s růstem vikkovitých rostlin, trávy i v kontrolní půdě (Tab. 12, Obr. 14). To potvrzuje hypotézu (1) a je v souladu s tvrzeními o rostoucí akumulaci dusíku v organické hmotě během sukcese (Inouye et al., 1987; Vitousek a Howarth, 1991; Walker a del Moral, 2011). Rychlost akumulace dusíku závisí především na přísunu opadu, který je na výsypkách pomalý a v málo rozvinuté vegetaci je ho málo (Chatterjee et al., 2009), což je patrné z hodnot dusíku na sukcesních plochách (Obr. 14), a to zejména na těch mladších.

Růst vikkovitých rostlin zvýšil množství celkového dusíku v půdě (Obr. 14). To poukazuje na přísun symbioticky fixovaného dusíku z kořenových exudátů vikkovitých rostlin. Kořenové exudáty vikkovitých rostlin obsahují vyšší množství dusíku než rostliny bez symbiotické fixace a toto obohacení dusíkem je tak základním mechanismem facilitace půdy s růstem vikkovitých rostlin (Paynel et al., 2001). Na nejmladších sukcesních plochách (S15, R15) není obohacení půdy dusíkem patrné (Obr. 14) a rostliny přidělovaly zřejmě přednostně dusík do svých tkání pro vlastní růst. Na nejstarších plochách (S60, R60) došlo k významnému vzrůstu dusíku v půdě pouze s travou (Obr. 14) navzdory tomu, že k tomu nemohlo dojít skrze symbiotickou fixaci. V úvahu přichází možnost, že půda v těchto dvou variantách obsahovala už při plnění květináčků vyšší podíl organické hmoty s vyšším obsahem dusíku.

Růst jetele bez konkurence trávy významně snížil množství dostupného fosforu na sukcesních plochách a nejmladší rekultivované ploše (R15), jak je vidět ve srovnání s kontrolní půdou (Obr. 11). To naznačuje vysokou spotřebu fosforu pro proces fixace dusíku z důvodu vyšší fixace u jetele než u jiných ostatních sledovaných rostlin. Kvůli přednostnímu zásobení kořenových hlízek fosforem je jeho spotřeba při fixaci dusíku vyšší než pro vlastní růst rostliny (Beck a Munns, 1984; Rotaru a Sinclair 2008). Např. na nejmladší rekultivované ploše (R15) lze zaznamenat vyšší pokles fosforu a zároveň vyšší růst jetele než na nejmladší sukcesní ploše (S15). Snížené množství fosforu je patrné i při růstu vikve na rekultivovaných plochách (R15, R60)

navzdory jejímu nízkému vzrůstu. Naopak růst štírovníku snížil množství fosforu pouze na nejstarší rekultivované ploše (R60) (Obr. 11). Při růstu jetele s travou ke snižování dostupného fosforu nedocházelo. Vysvětlením může být nižší fixace dusíku jetele v konkurenci, což se odrazilo v jeho sníženém růstu. Na středně staré rekultivované ploše (R20) je množství dostupného fosforu v půdě s jetelem, štírovníkem i travou dokonce vyšší než v kontrolní půdě (Obr. 11). Důvodem by mohly být jiné procesy v půdě, které se podílí na zpřístupňování fosforu.

Růst vikvovitých rostlin značně zvýšil ukládání uhlíku do půdy (Obr. 13). Přidělování většího množství uhlíku do půdy a sekvestraci uhlíku dokládá řada prací (př. Fisher et al., 1994; Fornara a Tilman, 2008; De Deyn et al., 2011; Gao et al., 2017). Příčinou je zvýšené vylučování kořenových exudátů bohatých na obsah uhlíku a dusíku a s tím obvykle spojena podpora růstu půdních mikroorganismů (Mawdsley a Bardgett, 1997; Denton et al., 1999). Ukládání uhlíku podpořil zvláště růst jetele na sukcesních plochách. Na nejstarší sukcesní ploše (S60) tak byla srovnatelná s hodnotami na nejstarší rekultivované ploše (R60) v kontrolní půdě (Obr. 13).

C:N poměr půdy se s růstem vikvovitých rostlin na rekultivovaných plochách v podstatě neměnil, a jejich růst tedy neovlivnil rychlost mineralizace organické hmoty na těchto plochách. Růst rostlin ale ovlivnil C:N na sukcesních plochách (Obr. 15). Růst jetele snížil C:N poměr na mladších sukcesních plochách (S15, S20), což je způsobeno vyšším obsahem dusíku v půdě s jetelem dodaným skrze jeho symbiotické fixaci (Obr. 14) a zároveň stálým obsahem uhlíku (Obr. 13). Na sukcesních plochách je zpočátku významně vyšší C:N půdy, kde rostla pouze tráva, ve srovnání s půdou s přítomností vikvovitých rostlin, ať už rostly v konkurenci nebo bez konkurence trávy (Obr. 15). To zaznamenali i Elgersma a Hassink (1997), a odkazuje to opět na zvýšení obsahu dusíku v půdě s růstem vikvovitých rostlin a vyšší podporu mineralizace dusíku v této půdě. I další autoři (Kardol et al., 2006; Van Der Heijden et al., 2008) naznamenali zlepšení mineralizace živin v půdách s vikvovitými rostlinami., navíc růst vikvovitých rostlin může zvýšit složitost půdní potravní sítě (Zhao et al., 2014). Největší rozdíl je zřetelný na nejmladší sukcesní ploše (S15), kde byl C:N poměr v půdě se samostatným růstem trávy zřetelně vyšší než hodnoty naměřené v ostatních půdách, a ukazuje na nižší mineralizaci dusíku, což souvisí s velmi nízkým obsahem dusíku v této variantě, který je nižší než v kontrolní půdě (Obr. 14).

Na rekultivovaných plochách růst samotné trávy zvýšil mikrobiální respiraci v půdě (Tab. 7, Obr. 9). Souvisí to s vylučováním půdních exudátů, které odporují vyšší mikrobiální aktivitě (Helingerová et al., 2010). Množství a složení kořenových exudátů se mezi různými druhy rostlin liší a specifická určitých exudátů u různých rostlin podporuje jen určité skupiny půdních

organismů (Rovira, 1969). Vikvovité rostliny vylučují především flavonoidy pro podporu druhově specifických rhizobií, se kterými vytváří symbiózu (Aoki et al., 2010). Proto zřejmě růst vikvovitých rostlin respiraci půdy významně neovlivnil.

S růstem vikvovitých rostlin se také měnila schopnost zadržování vody v půdě měřené jako vlhkost půdy. Růst jetele zlepšil zadržování vody na sukcesních plochách, vlhkost půdy s jetelem se na sukcesních plochách zvyšovala rychleji než v kontrolní půdě (Tab. 6, Obr. 8). Na ploše S30 byla půdní vlhkost nižší než na ploše S60 v půdě bez růstu rostlin. Na nejstarší sukcesní ploše (S60) byly vlhkostní poměry v půdě s jetelem dokonce lepší než na rekultivovaných plochách (Obr. 8). Zlepšení půdní vlhkosti by mohlo souviset s kořenovými exudáty, které mají schopnost navlhčit okolní částice (Walker et al., 2003), což má význam zvláště při vysychání půdy. Young (1995) ve své práci zjistil, že půda s exudáty v okolí kořenů byla vlhčí než okolní půda bez exudátů, což ukazuje, že exudáty v okolí kořenů zvyšují kapacitu půdy zadržovat vodu. Na rekultivovaných plochách byla situace zcela opačná, kdy růst jetele a zvláště štírovníku zadržování vody v půdě snížily (Obr. 8). Podobně štírovník vlhkostní poměry v půdě negativně ovlivnil na většině sukcesních ploch (S20, S30, S60) a stejně tak vikev na některých plochách (S30, S60, R15) (Obr. 8). To by mohlo souviset s vyšším odběrem vody v souvislosti s biomasou kořenů, která je u štírovníku vyšší (Obr. 7).

S růstem vikvovitých rostlin se měnilo půdní pH oproti kontrolní půdě. Jak ukazuje řada prací (Mengel a Steffens, 1982; Tang et al., 1997; Binkley et al., 2005), vikvovité rostliny kvůli příjmu většího množství kationtů než aniontů a uvolňováním protonů při fixaci dusíku a vylučováním exudátů dokáží významně snížit pH. To vysvětluje významný pokles pH nejmladší sukcesní ploše (S15) v půdě s vikvovitými rostlinami (Obr. 10), které kvůli velmi nízkému množství dusíku v půdě byly pravděpodobně odkázány pouze na dusík ze symbiotické fixace. Podobně tomu bylo v půdě s jetelem a štírovníkem na nejmladší rekultivované ploše (R15). Navzdory zřejmé fixaci dusíku i na jiných plochách k poklesu pH nedošlo. Vysvětlením by mohlo být, že v důsledku uvolňování protonů a s tím spojené alkalizaci v rostlinných tkáních akumulují rostliny organické anionty, které se mohou vracet do půdy a rozkládat se, a mohou tak zpětně neutralizovat pH (Mengel a Steffens, 1982). Navíc další rozkladné procesy v půdě jako je amonifikace, nitrifikace a denitrifikace ovlivňují pH, a konečná bilance pH tak závisí na mnoha faktorech. Na nejstarší rekultivované ploše (R60) je naopak patrné, že s růstem vikvovitých rostlin bylo půdní pH oproti půdě kontrolní naopak vyšší (Obr. 10). To by mohlo být způsobeno vyšší mineralizací v půdě s rostlinami a naopak nižší mírou vylučování protonů vikvovitými

rostlinami kvůli nižší míře fixace dusíku na této ploše, kde se dá předpokládat vyšší příjem dusíku z půdy. Ukázal se také rozdíl pH v půdě s jetelem v konkurenci s travou, kde bylo pH vyšší oproti pH půdy bez konkurence (Tab. 8, Obr. 10). Navzdory tomu, že biomasa trávy s jetelem byla velmi nízká oproti jiným variantám (Obr. 6), v půdě s konkurencí štírovníku ani vikve s travou není tento rozdíl patrný. Lze tedy usuzovat, že tento rozdíl nebyl způsoben přímou přítomností trávy, ale souvisí s jinými faktory jako mikrobiální aktivitou v půdě, která je v půdě s konkurencí trávy u jetele vyšší (Tab. 11, Obr. 13)

Růst samotné trávy pH půdy na sukcesních plochách neovlivnil, zatímco na rekultivovaných plochách její růst pH půdy zvýšil (Tab. 8, Obr. 10) což by vzhledem ke zvýšené respiraci (Tab. 7, Obr. 9) mohlo souviset se zvýšeným aerobním rozkladem. Je také možné, že tráva přijímala dusík ve formě dusičnanu, který mohl být na rekultivovaných plochách dostupnější, a s kterým je spojeno uvolňování OH^- a vzrůst pH. Ovšem uvádí se, že dusík ve formě dusičnanu rostliny přijímají přednostně při vyšší aciditě půdy a amonný dusík je celkově přijímán přednostněji (Marschner et al., 1995), a ve zkoumané půdě je pH alkalické, ale i tak tuto variantu nelze zcela vyloučit.

Růst jetele a štírovníku snížil obsah dostupného železa na starších sukcesních plochách (S30, S60) a nejstarší rekultivované ploše (R60) (Obr. 12). Snížené hodnoty oproti kontrolní půdě by mohly poukazovat na zvýšený příjem železa vikvovitými rostlinami pro fungování hlízek a zajištění symbiotické fixace (Tang et al., 1990). Při růstu jetele s konkurencí trávy k poklesu množství dostupného železa nedošlo (Tab. 10) a je srovnatelné s obsahem v kontrolní půdě, navzdory tomu, že při růstu jetele muselo také docházet ke zvýšenému příjmu železa kvůli fixaci dusíku. Také v půdě s růstem vikve bylo dostupného železa více než v ostatních půdách a dokonce více, než v kontrolní půdě. V úvahu připadá variabilita odebrané půdy v květináčích, ke které i přes homogenizaci půdy před setím rostlin mohlo dojít.

6. Závěr

- Výsledky ukazují, že růst tří pěstovaných zástupců r. Fabaceae se zvyšuje ze sukcesním stářím plochy a reaguje tak na zlepšující se podmínky půdy. Schopnost a rychlost růstu sledovaných zástupců se liší v závislosti na druhové strategii a míře symbioticky fixovat dusík. Nejvíce se ve výsypkovém substrátu dařilo jeteli lučnímu (*Trifolium pratense*), méně rostl štírovník růžkatý (*Lotus corniculatus*), a vikev ptačí (*Vicia cracca*) naopak vůbec neprosplávala.
- Sledované druhy vikvovitých rostlin rostou rychleji na rekultivovaných plochách než na plochách vyvíjejících se spontánní sukcesí, ale rostoucím stářím ploch se rozdíly zmenšují, a růst rostlin tak odráží pomalejší vývoj půdy na výsypce při spontánní sukcesí.
- Růst trávy (*Poa compressa*) v konkurenci s vikvovitými rostlinami se zvyšuje a reaguje tím na vzrůstající množství dusíku v půdě během sukcese a přísun dusíku ze symbiotické fixace vikvovitými rostlinami.
- Během sukcese kvůli zvyšujícímu množství dusíku v půdě roste vliv konkurence trávy a snižuje růst vikvovitých rostlin. Nejméně konkurence trávy ovlivňuje růst jetele lučního, naopak viki ptačí tráva přerůstá.
- Růst sledovaných druhů vikvovitých rostlin skrze kořenové exudáty zvyšuje množství dusíku v půdě a působí na další poměry v půdě. Zejména růst jetele lučního urychluje akumulaci organického uhlíku, zlepšuje půdní vlhkost, ovlivňuje množství dostupného fosforu a železa a pH půdy.

Výsledky ukazují úspěšný růst jetele lučního a štírovníku růžkatého během primární sukcese ve výsypkovém substrátu chudém na obsah dusíku a dostupného fosforu. Potvrzují se jejich facilitativní účinky na půdu zároveň nízký účinek konkurence trávy s těmito druhy rostlin při primární sukcesí. Jetel luční a štírovník růžkatý se proto ukazují jako vhodné druhy rostlin pro nastolení vhodných podmínek půdy pro přirozenou obnovu luční vegetace na výsypce po těžbě uhlí.

Symbiotická fixace dusíku zvyhodňuje tyto rostliny v podmínkách nízkého množství dusíku v půdě, jako je tomu při primární sukcesí. Při sekundární sukcesí půda obsahuje zásobu dusíku z předchozího růstu rostlin (Connell a Slatyer, 1977). Lze očekávat, že zásoba dusíku dovolí v počátečních fázích rychlý růst vikvovitých rostlin a zároveň růst ostatních rostlin, který nebude omezen nízkou dostupností dusíku (Rastetter et al., 2001). V pozdějších fázích sukcese bude vlivem zvýšené akumulaci dusíku v půdě snížena schopnost symbiotické fixace dusíku a růst

vikvovitých rostlin bude dále snižován konkurencí ostatních rostlin o živiny a světlo a povede ke kompetičnímu vyloučení vikvovitých rostlin (Vitousek a Field, 1999). Další studium růstu vikvovitých rostlin na výsypkách po těžbě uhlí je proto vhodné směřovat tímto směrem.

7. Použitá literatura

Abdel-Wahab, H. H., Zahran, H. H., 1979. Salt tolerance of Rhizobium species in broth culture. Z. Allg. Mikrobiol., 19, 681–685.

Abdel-Wahab, H. H., Zahran, H. H., 1983. The effects of water stress on N₂ (C₂H₂)-fixation and growth of Medicago sativa L. Acta Agron. Acad. Sci. Hung., 32, 114–118.

Adams, A. M., Turnbull, T. L., Sprent, J., Buchmann, N., 2016. Legumes are different: Leaf nitrogen, photosynthesis, and water use efficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences. 113. 201523936.

Aerts, R., Boot, R. G. A., Vandraart, P. J. M., 1991. The relation between aboveground and belowground biomass allocation patterns and competitive ability. Oecologia 87,551–559

Albrecht, S. L., Bennett, J. M., Boote, K. J.. 1994. Relationship of nitrogenase activity to plant water stress in field grown soybeans. Field Crop Res., 8, 61–71.

Allen, R. M., Roll, J.T. Rangaraj, P. Shah, V.K. Roberts, G.P. and Ludden, P.W., 1999. Incorporation of molybdenum into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. J. Biol. Chem. 274, 15869–15874.

Almeida J. P. F., Hartwig U. A., Frehner M., Nösberger J., Lüscher A., 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens*). J. Exp. Bot., 51, 1289–1297.

Al-Niemi TS, Kahn ML, McDermott TR. 1998. Phosphorus uptake by bean nodules. Plant and Soil 198, 71-78.

Alva, A.K., Kerven, G.L., Edwards, D.G. and Asher, C.J., 1991. Reduction in toxic aluminum to plants by sulfate complexation. Soil Sci., 152, 351–359.

Amossé, C., Jeuffroy, M. H., Mary, B., & David, C., 2014. Contribution of relay intercropping with legume cover crops on nitrogen dynamics in organic grain systems. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 98, 1–14.

Aoki, S. K., Diner, E. J., de Roodenbeke, C. T., Burgess, B. R., Poole, S. J., Braaten, B. A., et al., 2010. A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* 468, 439–442.

Appleby, C. A., 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. Annual Review of Plant Physiology 33, 443-478. Beijerinck, M. W. Über oligonitrophile Mikroben. Zbl. Bakt. 7, 561-582 (1901)

Banath, C. L., Greenwood, E.A.N and Loneragan, J. F., 1966. Effects of calcium deficiency on symbiotic nitrogen fixation. Plant Physiol. 41, 760-763.

Barber, L. D., Joern, B. C., Volenec, J. J., Cunningham, S. M., 1996. Supplemental nitrogen effects on alfalfa regrowth and nitrogen mobilization from roots. Crop Sci 36,1217–1223

Bardgett, R. D., Streeter, T. and Bol, R. 2003. Soil microbes compete effectively with plants for organic-nitrogen inputs to temperate grasslands. Ecology, 84, 1277–1287.

- Bayoumi, H. E. A., Biro, B. Balazsy, S., Kecskes, M., 1995. Effects of some environmental factors on Rhizobium and Bradyrhizobium strains. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 42, 61–69.
- Beck, D. P., and Munns, D. N., 1984. Phosphate nutrition of Rhizobium sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 278–282.
- Bednarek, W., Tkaczyk, P., 2002. The influence of mineral fertilization on the content of some nitrogen forms in soil. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 484, 55–60.
- Bell, R. W., Edwards, D. J., Asher, C. J., 1989. External calcium requirements for growth and nodulation of six tropical food legumes grown in flowing solution culture. *Aust. J. Agric. Res.*, 40, 85–96.
- Beschow, H., Schulze, J., Merbacha, W., 2000. Transfer of symbiotically fixed in an alfalfa-grass mixture studied through isotope dilution in a pot experiment. *Isotopes Environ. Health Stud.* 36, 21–33.
- Binkley, D., Binkley, D. R., Menyailo, O. 2005. How nitrogen-fixing trees change soil carbon. *Tree Species Effects on Soils: Implications for Global Change*, Dordrecht NATO Science Series, Springer. Pp 155-164.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press Limited, London, 889 pp. ISBN 0-12-473543-6
- Bolanos, L., Brewin, N.J. and Bonilla, I., 1996. Effects of boron on Rhizobium-legume cell-surface interactions and nodule development. *Plant Physiol.* 110, 1249-1256.
- Bordeleau, L. M., Prevost, D., 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* 161, 115–124.
- Bradshaw, A., 1997. Restoration of mined lands—using natural processes. *Ecol. Eng.* 8, 255–269.
- Braun, M., Schmid, H., Grundler, T., Hulsbergen, K.J., 2010. Root and- shoot growth and yield of different grass clover mixtures. *Plant Biosyst* 144, 414-419
- Brockwell, J., Bottomley, P. J., Thies, J. E., 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174, 143–180.
- Brockwell, J., Pilka, A., Holliday, R. A. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring Rhizobium meliloti in non-cultivated soils of New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric.* 31, 211–219.
- Brodrick, S.J. and Giller, K.E., 1991. Genotypic difference in molybdenum accumulation affects N₂ fixation in tropical Pharus vulgaris. *J. Exp. Bot.* 42, 1339-1343.
- Brophy, L S., Heichel, G. H., 1989. Nitrogen release from roots of alfalfa and soybean grown in sand culture. *Plant and Soil* 116, 77-84
- Buerkert, A., K. G. Cassman, R. de la Piedra, and D. N. Munns. 1990. Soil Acidity and Liming Effects on Stand, Nodulation, and Yield of Common Bean. *Agron. J.*, 82, 749-754.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones., R. L. Biochemistry and molecular biology of plants. John Wiley & Sons, 2015.

- Busse, M. D., Bottomley, P. J.. 1989. Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2431–2436.
- Bustamante, M. M. C., Medina, E., Asner, G. P., Nardoto, G. B., Garcia-Montiel, D. C., 2006. Nitrogen cycling in tropical and temperate savannas. *Biogeochemistry* 79, 209–237.
- Butler, J. H. A., Lad, J. N. 1985. Growth and nitrogen-fixation by *Medicago littoralis* in pot experiments — effect of plant density and competition from *Lolium multiflorum*. *Soil Biol. Biochem.* 17, 255–256.
- Caetano-Anolles, G., Lagares, A., Favelukes, G., 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: dependence on divalent cations and pH. *Plant Soil* 117, 67–74.
- Callaway, R. M., 1995. Positive interactions among plants, *Bot. Rev.*, 61, 306–349.
- Callaway, R. M., Walker L. R., 1997. Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology* 78, 1958–1965.
- Cantoira, R., Galera, C., Françoise de Billy, Varma Penmetsa, R., Journet, E. P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C., Dénarié, J., 2000. Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *The Plant Cell Sep.* 12 (9) 1647-1665
- Carter, J. M., Gardner, W. K., Gibson, A. H.. 1994. Improved growth and yield of faba beans (*Vicia faba* cv. Fiord) by inoculation with strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in acid soils in south-west Victoria. *Aust. J. Agric. Res.*, 45, 613–623.
- Casper, B. B., Jackson, R. B., 1997. Plant competition underground. *Annu Rev Ecol Syst* 28, 545–570
- Cassman, K. G., A. S. Witney, and R. L. Fox., 1981. Phosphorus requirements of soybean and cowpea as affected by mode of N nutrition. *Agron. J.*, 73, 17–22.
- Cech, P. G., Edwards, P. J., Olde Venterink, H., 2010. Why is the abundance of herbaceous legumes low in African savanna? A test with two model species. *Biotropica* 42, 580–589.
- Connell, J. H., Slatyer, R. O., 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist* 111, 1119–1144.
- Correa, O. S., Barneix. A. J., 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 153–157.
- Cowles, J.R., Evans, H.J., Russell, S.A., 1969. B12 coenzyme-dependent ribonucleotide reductase in *Rhizobium* species and the effects of cobalt deficiency on the activity of the enzyme. *J Bacteriol.* 97(3), 1460-5.
- Davidson, Eric., Carvalho, Cláudio & Michela Figueira, Adelaine & Ishida, Yoko & Ometto, Jean & Nardoto, Gabriela & Tuma Sabá, Renata & N Hayashi, Sanae & C Leal, Eliane & Guimarães Vieira, Ima & Martinelli, Luiz., 2007. Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. *Nature.* 447. 995-8.

- De Deyn, G. B., Shiel, R. S., Ostle, N. J., McNamara, N. P., Oakley, S., Young, I., Freeman, C., Fenner, N., Quirk, H. and Bardgett, R. D., 2011, Additional carbon sequestration benefits of grassland diversity restoration. *Journal of Applied Ecology*, 48, 600-608
- Delgado, M. J., Ligeró, F., Lluç, C., 1994. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil. Biol. Biochem.*, 26,371–376.
- Denton, C. S., Bardgett, R. D., Cook, R., Hobbs, P. J., 1999. Low amounts of root herbivory positively influence the rhizosphere microbial community in a temperate grassland soil. *Soil Biol Biochem* 31,155–165
- Dhamala, N. R., Rasmussen, J., Carlsson, G., Sørengaard, K., Eriksen, J., 2018. Effects of including forbs on N₂-fixation and N yield in red clover-ryegrass mixtures. *Plant and Soil*. 424.
- Dilworth, M.J. and Loneragan, J.E, 1991. An alternative nitrogenase is not expressed in molybdenum-deficient legume root nodules. *New Phytol.* 118, 303-308.
- Dilworth, M.J., Robson, A.D. and Chatel, D.L. 1979. Cobalt and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius* L. 11. Nodule formation and function. *New Phytologist*, 83, 63-79.
- Dixon, R. O. D., and Wheeler, C. T., 1986. *Nitrogen fixation in plants*. Blackie, Glasgow, United Kingdom, 192pp.
- Drake, D., 2011. Invasive legumes fix N₂ at high rates in riparian areas of an N-saturated, agricultural catchment. *J. Ecol.* 99, 515–523.
- Drevon, J. J., Hartwig, U. A., 1977. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa, *Planta* 201, 463–469.
- Elgersma, A., Hassink, J., 1997. Effects of white clover (*Trifolium repens* L.) on plant and soil nitrogen and soil organic matter in mixtures with perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant and Soil*, 197, 177–186.
- Elgersma, A., Schlepers, H., Nassiri, M., 2000. Interaction between perennial ryegrass and white clover under contrasting nitrogen availability: productivity, seasonal patterns of species composition, N₂ fixation, N transfer and N recovery. *Plant Soil* 221, 281–299.
- Epstein, E. and Bloom, A. J., 2005. *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*, 2nd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Evans, L. S., Lewin, K. F., Vella, F. A., 1980. Effect of nutrient medium pH on symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum* *Plant Soil*, 56,71
- Faget, M., Nagel, K. A., Walter, A., Herrera, J. M., Jahnke, S., Schurr, U., 2013. Root–root interactions: Extending our perspective to be more inclusive of the range of theories in ecology and agriculture using in-vivo analysis. *Annals of Botany*, 112, 253–266.
- Figueiredo, M.V.B., Mergulhão, A.C.E.S., Sobral, J.K., Junior, M.A.L. and Araújo, A. S.F., 2013. Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity, and estimates. In: N.K. Arora (ed.) *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, Spring India, pp. 267-289

- Fisher, M. E., Rao, I. M., Ayarza, M. A., Lascano, C. E., Sanz, J. I., Thomas, R. J., Vera, R. R., 1994. Carbon storage by introduced deep-rooted grasses in the South American savannas. *Nature* 371, 236±238.
- Fornara, D., Tilman, D., 2008. Plant Functional Composition Influences Rates of Soil Carbon and Nitrogen Accumulation. *Journal of Ecology*, 96, 314-322.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387:394–401.
- Frouz, J., Prach, K., Pižl, V., Háněl, L., Starý, J., Tajovský, K., Materna, J., Balík, V., Kalčík, J., Řehounková, K., 2008. Interactions between soil development, vegetation and soil fauna during spontaneous succession in post mining sites. *European Journal of Soil Biology* 44, 109-121
- Fuhrmann, J., Davey, C. B., Wollum, A. G.. 1986. Desiccation tolerance in clover rhizobia in sterile soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 639–644.
- Gao, D., Wang, X, Fu, S., Zhao, J., 2017. Legume Plants Enhance the Resistance of Soil to Ecosystem Disturbance. *Front. Plant Sci.* 8, 1295.
- Graham, P. Draeger, H. K., Ferrey, M. L. Conroy, M. J., B. E. Hammer, E. Martinez, S. R. Naarons, and C. Quinto. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* 40, 198–207.
- Graham, P. H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38:475– 484.
- Graham, P. H. and Vance, C.P., 2000. Nitrogen fixation in perspective, an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.*, 65, 93-106.
- Graham, P. H. and Vance, C.P., 2003. Legume Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131, 872-877
- Graham, P. H., Viteri, S. E., Mackie, F., Vargas, A. T., Palacios, A., 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5, 121–128.
- Gremaud, F. M., Harper, E. J., 1989. Selection and Initial Characterization of Partially Nitrate Tolerant Nodulation Mutants of Soybean. *Plant physiology*. 89. 169-73. 10.1104/pp.89.1.169.
- Gulden, R. H., Vessey, J. K. 1997. The stimulating effect of ammonium on nodulation in *Pisum sativum* L. is not long lived once ammonium supply is discontinued. *Plant and Soil* 195, 195-205.
- Gylfadottir, T., Helgadottir, A., Høgh-Jensen, H., 2007. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. *Plant and Soil* 297,93-104
- Haase, S., Neumann, G., Kania, A., Kuzyakov, Y., Römheld, V., Kandeler, E., 2007. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biol. Biochem.*, 39, 2208–2221.
- Hamblin, A. P., Tennant, D., 1987. Root length density and water uptake in cereals and grain legumes: how well are they correlated?. *Australian Journal of Agricultural Research - AUST J AGR RES.* 38.

Hart, A. L. 1989. Distribution of phosphorus in nodulated white clover plants. *J. Plant Nutr.*, 12, 159–171.

Helingerová, M., Frouz, J., Santruckova, H., 2010. Microbial activity in reclaimed and unreclaimed post-mining sites near Sokolov (Czech Republic). *Ecological Engineering*. 36. 768-776.

Hellsten, A., Huss-Danell, K., 2000. Interaction Effects of Nitrogen and Phosphorus on Nodulation in Red Clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Plant Soil Science*, 50:3, 135-142,

Høgh-Jensen H., Schjoerring J. K., Soussana J. F. 2002. The influence of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of white clover plants. *Ann. Bot.*, 90, 745–753.

Høgh-Jensen, H., and Schjoerring, J. K. 1997. Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N₂ fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. *Plant Soil*, 197, 187–199.

Høgh-Jensen, H., Nielsen, B, Thamsborg, S. M., 2006. Productivity and quality, competition and facilitation of chicory in ryegrass/legume-based pastures under various nitrogen supply levels. *Eur J Agron* 24:247-256

Høgh-Jensen, H., Schjoerring, J. K., 2000. Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: direct quantification by N-15 leaf feeding compared with indirect dilution of soil N-15. *Plant and Soil* 227, 171-183

Hubbell, D. H. & Kidder, G. Biological Nitrogen Fixation. University of Florida IFAS Extension Publication SL16. 1-4 (2009).

Hungate B. A., Dijkstra, P., Johnson, D. W., Hinkle, C. R, Drake, B. G. 1999. Elevated CO₂ increases nitrogen fixation and decreases soil nitrogen mineralization in Florida scrub oak. *Glob. Change Biol.* 5, 781–789.

Hungria, M., Franco, A. A.. 1993. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 149, 95– 102.

Hunt, P. J., Wollum, A. G. Matheny, T. A., 1981. Effects of soil water on *Rhizobium japonicum* infection nitrogen accumulation and yield in bragg soybean. *Agric., J.* 73, 501–505.

Huss-Danell K., Chaia E., Carlsson G., 2007. N₂ fixation and nitrogen allocation to above- and belowground plant parts in red clover grasslands. *Plant and Soil*, 299, 215–226.

Chatterjee A, Lal R, Shrestha R. K, Ussiri D., 2009. Soil carbon pools of reclaimed minesoils under grass and forest landuses. *Land Degrad Dev* 20, 300–307.

Ibekwe, A. M., Angle, J. S., Chaney, R. L, Vonberkum, P., 1997. Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 61, 103–111.

Inouye, R. S., Huntly, Tilman, N. J. D., Tester, J. R., Stillu'ell, M., Zinnel. K., 1987. Old-field succession on a Minnesota sand plain. *Ecolog~*,68, 12-26.

Jakobsen, I., 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum*, 64,190-196

- Jayasundara, H. P. S., Thomsom, B. D., Tang, C., 1998. Responses of cool season grain legumes to soil abiotic stresses. *Adv. Agron.* 63, 77–151.
- Jefferies, R. A., A. D. Bradshaw, and P. D. Putwain. 1981. Growth, Nitrogen Accumulation and Nitrogen Transfer by Legume Species Established on Mine Spoils. *Journal of Applied Ecology* 18, no. 3, 945-56.
- Jordan, A. and Reichard, P., 1998. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem.* 67, 71-98.
- Kaczor, C.M., Smith, M.W., Sangwan, I., O'Brian, M.R., 1994. Plant δ -aminolevulinic acid dehydratase. Expression in soybean root nodules and evidence for a bacterial lineage of the Alad gene. *Plant Physiol.* 104, 1411–1417.
- Karanja, N. K., Wood., M. 1988. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya. Tolerance of high temperature and antibiotic resistance. *Plant Soil* 112, 15–22.
- Kardol, P, Martijn-Bezemer, T, Putten, W. H. 2006. Temporal variation in plant–soil feedback controls succession. *Ecology Letters* 9, 1080– 1088.
- Kaschuk, G., Leffelaar, P. A., Giller, K. E., Alberton, O., M. Hungria, T.W. Kuyper. 2010. Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses, *Soil Biol. Biochem.* 42, 125–127.
- Keyser, H. H., Somasegaran P., Bohlool. B. B. 1993. Rhizobial ecology and technology, p. 205–226. In F. Blaine Metting (ed.), *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management.* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Kishinevsky, B. D., Sen, D., Weaver, R. W., 1992. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. *Plant Soil*, 143, 275–282.
- Kleinert, A., Venter, M., Kossmann, J., Valentine, A. J., 2004. Photosynthetic and respiratory partitioning in Lupins during P deficiency, *J. Plant Physiol.* 171, 1619–1624.
- Koffel, T., Boudsocq, S., Loeuille, N. and Daufresne, T., 2018, Facilitation- vs. competition-driven succession: the key role of resource-ratio. *Ecol Lett*, 21, 1010-1021.
- Körner, C., Stöcklin, J., Reuther-Thiébaud, L., & Pelaez-Riedl, S., 2008. Small differences in arrival time influence composition and productivity of plant communities. *New Phytologist*, 177, 698–705.
- Kutschera, L, Lichtenegger, E., 1982. *Wurzelatlas mitteleuropäischer Grünlandpflanzen. Band 1, Monocotyledoneae.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Ledgard, S. F., Steele, K. W., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant Soil.* 141, 137-153.
- Lesuffleur, F., Paynel, F., Bataillé, M. P., Le Deunff, E., & Cliquet, J. B., 2007. Root amino acid exudation: Measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant and Soil*, 294, 235–246.
- Leung, K., and Bottomley, P. J. 1987. Influence of phosphate on the growth and nodulation characteristics of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2098-2105.

Licht, S., Gerfen, G.J. and Stubbe, J., 1996. Thiel radicals in ribonucleotide reductases. *Science*, 271, 477–481.

Mawdsley, J. L, Bardgett, R. D. 1997. Continuous defoliation of perennial rye grass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) and associated changes in the microbial population of an upland grassland soil. *Biol Fertil Soils* 24, 52–58

McElroy, M. S., Papadopoulos, Y. A., Glover, K. E., Dong, Z., Fillmore, S.A.E, Johnston, M. O., 2017. Interactions between cultivars of legume species (*Trifolium pratense* L., *Medicago sativa* L.) and grasses (*Phleum pratense* L., *Lolium perenne* L.) under different nitrogen levels. *Canadian Journal of Plant Science*, 97, 214-225

Mengel, K. & Kirkby, E.A. 1982. Principles of plant nutrition. 3rd ed. International Potash Institute, Bern

Mengel, K., Steffens, D., 1982. Relationship between the cation/anion uptake and the release of protons by roots of red clover. *Z Pflanzenernähr Bodenkd* 145, 229–236

Michiels, J., Verreth, C., Vanderleyden, J.. 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1206–1212.

Millett, J., Godbold, D., Smith, A., Grant, H., 2011. N₂ fixation and cycling in *Alnus glutinosa*, *Betula pendula* and *Fagus sylvatica* woodland exposed to free air CO₂ enrichment. *Oecologia*. 169. 541-52.

Moawad, H., and Beck, D., 1991. Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field-grown lentil. *Soil Biol. Biochem*, 23, 917–925.

MÖLLEROVÁ J. (2006): Symbiotická fixace dusíku. *Rhizobium* s. l. a *Frankia*. – Živa, Academia, Praha, (1), 9–13.

Mudrak, O., Frouz, J., Velichova, V., 2010. Understory vegetation in reclaimed and unreclaimed post-mining forest stands. *Ecological Engineering* 36, 783-790.

Munevar, F., Wollum, A. G., 1982. Response of soybean plants to high root temperature as affected by plant cultivar and *Rhizobium* strain. *Agron. J.*, 74,138–142.

Munns, D. N., Keyser, H. H., Fogle V. W., J. S. Hohenberg, T. L. Righetti, D. L. Lauter, M. G. Zaruog, K. L. Clarkin, and K. W. Whitacre. 1979. Tolerance of soil acidity in symbiosis of mung bean with rhizobia. *Agron. J.* 71, 256–260.

O’Hara, G.W., Boonkerd, N., Dilworth, M.J., 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 108, 93–110.

O’Hara G. W., 2001. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review, *Aust. J. Exp. Ag.* 41, 417-433

Ohwaki, Y., Sugahara, K., 1993. Genotypic differences in response to iron deficiency between sensitive and resistant cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Soil* 155/156, 473–476.

Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A., 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5566–576

- Osa-Afina, L. O., and Alexander, M. 1982. Difference among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 435–439.
- Paynel, F., Lesuffleur, F., Bigot, J., Diquélou, S., and Cliquet, J. 2008. A study of ^{15}N transfer between legumes and grasses. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 281–290.
- Paynel, F., Murray, P. J., Cliquet, J. 2001. Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant Soil*, 229, 235–243.
- Pena-Cabriaes, J. J., Castellanos, J. Z., 1993. Effect of water stress on N_2 fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 15, :151–155.
- Peoples, M. B., Ladha, J. K., Herridge, D. F. 1995. Enhancing legume N_2 fixation through plant and soil management. *Plant Soil* 174, 83–101.
- Perakis, S. S, Sinkhorn, E. R, Compton, J. E., 2011. $\delta^{15}\text{N}$ constraints on long-term nitrogen balances in temperate forests. *Oecologia* 167, 793–807.
- Piha, M. I., Munnus D. N., 1987. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil* 98, 183–194.
- Pijnenberg, J.W., Lie M., 1990. Effect of lime-pelleting on the nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in acid soil: A comparative study carried out in the field, in pots and in rhizotrons. *Plant Soil*, 121, 225–234.
- Pirhofer-Walzl K., Rasmussen, J., Jensen, H. H., Eriksen, J., Sjøgaard K, Rasmussen J. 2012. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. *Plant Soil*. 350, 71–84.
- Poorter, H., Bühler, J., van Dusschoten, D., Climent, J., and Postma, J.A. 2012. Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Funct. Plant Biol.* 39: 839–850.
- Poorter, H., Jagodzinski, A. M., Ruiz-Peinado, R., Kuyah, S., Luo, Y., Oleksyn, J., Sack, L., 2015. How does biomass distribution change with size and differ among species? An analysis for 1200 plant species from five continents. *New Phytologist*, 208, 736–749.
- Postgate J. R. 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 262pp.
- Prach, K., Bartha, S., Joyce, C. H. B., Pšek, P., Van Diggelen, R., Wiegleb, P. 2001. The role of spontaneous vegetation succession in ecosystem restoration: a perspective, *Appl. Veg. Sci.* 4, 111–114.
- Ramirez-Garcia, J., Martens, H. J., Quemada, M., Thorup-Kristensen, K., 2014. Intercropping effect on root growth and nitrogen uptake at different nitrogen levels. *Journal of Plant Ecology*, 8, 380–389.
- Rasmussen, J., Eriksen, J. Jensen, E. S., Esbensen, K. H., Høgh-jensen H., 2007. In situ carbon and nitrogen dynamics in ryegrass-clover mixtures: Transfers, deposition and leaching. *Soil Biol. Biochem.*, 39, 804–815.
- Rasmussen, J., Gylfadóttir, T., Loges, R., Eriksen, J., Helgadóttir, A., 2013. Spatial and temporal variation in N transfer in grass–white clover mixtures at three Northern European field sites. *Soil Biology and Biochemistry*. 57, 654–662.

- Rastetter, E., Vitousek, P., Field, C., Shaver, G. R., Herbert, D., Gren, G.I., 2001. Resource optimization and symbiotic nitrogen fixation. *Ecosystems* 4, 369-388.
- Richter, R., Hlušek, J., 1994. *Výživa a hnojení rostlin (I. obecná část)*. VŠZ v Brně, 177 s. ISBN 80-7157-138-5
- Robson, A. D., O'Hare, G. W., Abbott, L. K., 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Australian Journal of Plant Physiology*, 8, 427-436
- Rogers, J. B., Laidlaw A. S., Christie P., 2001. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in the transfer of nutrients between white clover and perennial ryegrass, *Chemosphere* 42, 153-159.
- Rotaru, V., Sinclair, R. T., 2009. Influence of Plant Phosphorus and Iron Concentrations on Growth of Soybean. *Journal of Plant Nutrition - J Plant Nutr.* 32, 1513-1526.
- Rovira, A. D., 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review*, 35, 35-57.
- Sa, M., Israel, D. T., 1991. Energy Status and Functioning of Phosphorus-Deficient Soybean Nodules. *Plant physiology*. 97, 928-35.
- Sattler, J., Bartelheimer, M., 2018. Root responses to legume plants integrate information on nitrogen availability and neighbour identity. *Basic and applied ecology*, 27, 51-60.
- Saxena, A. K., and Rewari. R. B., 1991. The influence of phosphate and zinc on growth, nodulation and mineral composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 202-205.
- Sheoran, A.S., Sheoran, V., and Poonia, P. 2008. Rehabilitation of mine degraded land by metallophytes. *Mining Engineers Journal* 10 (3), 11-16
- Schwinning, S., Parsons, A.J., 1996. Analysis of the coexistence mechanisms for grasses and legumes in graz- ing systems. *Journal of Ecology*, 84, 799-813
- Simpson, D., Daft, M. J., 1991. Effects of *Glomus clarum* and water stress on growth and nitrogen fixation in two genotypes of groundnut. *Afr. Ecosyst. Environ.*, 35,47-54.
- Singleton, P. W., Abel Magid, H. M., and Tavares, J. W., 1985. Effect of phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 49, 613-616.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S., Denef, K., 2004. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Tillage Res.* 79, 7e26.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W., 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.*, 6, 2897-2903.
- Snowball, K., Robson, A.D., Loneragan, J .F., 1980. The effect of copper on nitrogen fixation in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*). *New Phytol.*, 85, 63-72.
- Spehn, E. M., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Hector A., Caldeira, M.C., Dimitrakopoulo,s P.G., Finn, J.A., Jumpponen A., O € Donnovan, G., Pereira J.S., Schulze, E.-D., Troumbis, A.Y., Körner, C., 2002. The role of legumes as a component of biodiversity in a cross-European study of grassland biomass nitrogen. *Oikos*, 98, 205-218.

- Sprent, J. I., Sprent, P. 1990. Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall, London, 99 p. Streeter, J. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* 7, 1–23.
- Sprent, J. I., Stephens, J. H., Rupela, O. P., 1988. Environmental effects on nitrogen fixation. In *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Ed. R J Sumerfield. pp 801–810. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sprent, J. I., Zahran, H. H.. 1988. Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity, p. 145–151. In D. P. Beck and L. A. Materon (ed.), *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, Dordrecht, The Netherlands.
- Ta, T. C., Faris, M. A., 1987. Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant and Soil* 98, 265–274
- Tang, C. X., Robson, A. D., Dilworth, M. J., 1990. The role of iron in nodulation and nitrogen-fixation in *Lupinus angustifolius* L. *New Phytol.* 114, 173–182
- Tang, C., Barton, L. McLay, C. D. A., 1997. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37, 563–570.
- Tang, C., Thomson, B. D., 1996. Effects of solution pH and bicarbonate on the growth and nodulation of a range of grain legumes. *Plant Soil*, 186, 321–330.
- Tang, C., Zheng, S. J., Qiao, Y. F., Wang, G.H., Han, X. Z., 2006. Interactions between high pH and iron supply on nodulation and iron nutrition of *Lupinus albus* L. genotypes differing in sensitivity to iron deficiency. *Plant Soil* 279, 153–162.
- Tate, R. L. 1995. *Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation)*, p. 307– 333. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Temperton, V. M., Mwangi, P. N., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Buchmann, N., 2007. Positive interactions between nitrogen-fixing legumes and four different neighbouring species in a biodiversity experiment. *Oecologia*, 151, 190–205.
- Thies, J. E., Woome, P. L. Singleton, P. W. 1995. Enrichment of Bradyrhizobium spp. populations in soil due to cropping of the homologous host legume. *Soil Biol. Biochem.* 27, 633–636.
- Thornley, J. H. M. 2001. Simulating grass-legume dynamics: a phenomenological submodel. *Ann. Bot.* 88: 905–913.
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M., and Willis, A.J. 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* 41, 219–228.
- Valentine, A., Kleinert, A., Benedito, V., 2017. Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules. *Plant Science* 256, 46–52
- Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D. and Van Straalen, N. M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296–310.
- Vance C. P., Uhde-Stone C., Allan, D. L, 2003. Phosphorus acquisition in low-nutrient environments, *Plant Soil* 245, 35–47.

- Vargas, A. A. T., Graham, P. H., 1988. Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Res.*, 19, 91–101.
- Vassileva, V., G. Milanov, G. Ignatov, and B. Nikolov., 1997. Effect of low pH on nitrogen fixation of common bean grown at various calcium and nitrate levels. *J. Plant Nutr.* 20, 279–294.
- Vitousek, P. M., R. W. Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13,87–115.
- Vitousek, P. M., Farrington, H., 1997. Nutrient limitation and soil development: experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry* 37, 63–75
- Vitousek, P. M., Field, C. B., 1999. Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: a simple model and its implications. *Biogeochemistry* 46,179–202.
- Vitousek, M. P., Porder, S., Houlton, B. Z. Chadwick, Oliver. 2010. Terrestrial phosphorus limitation: Mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecological applications* : a publication of the Ecological Society of America. 20. 5-15.
- Voisin, Anne-Sophie., Salon, Ch., G. Munier-Jolain, N., Ney, B., 2002. Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil.* 242. 251-262.
- Wagner, S. C.. 2011. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* 3(10):15
- Walker, R. L. 1993. Nitrogen fixers and species replacements in primary succession. In: Miles J and WaltonDWH(eds) *Primary Succession on Land*, pp. 249–272. London: Blackwell
- Walker, R. L., del Moral, R., 2011. Primary Succession. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley, Chichester, pp. 1-8
- Walker, R. L., del Moral, R., 2013. *Primary Succession and Ecosystem Rehabilitation*. Cambridge University Press, Cambridge. 456 pp.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., and Vivanco, J. M., 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132, 44–51.
- Weaver, R. W., Frederick, L. R., Dumenil. L. C., 1971. Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils. *Soil Sci.*, 114,137-141.
- Weidlich, E., von Gillhausen, P., Max, J., Delory, B., D. Jablonowski, N., Rascher, U., Temperton, V., 2017). Priority effects caused by plant order of arrival affect belowground productivity. *Journal of Ecology.* 106.
- Wiedenhoeft, A. C. 2006. *Plant Nutrition (The Green World)*. By Infobase Publishing. 132 West 31st Street New, 153pp.
- Wichern, F., Eberhardt, E., Mayer, J., Joergensen, R. G., Muller, T., 2008. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. *Soil Biol Biochem* 40:30-48
- Worrall, V. S., Roughley, R. J.. 1976. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii* Dang. *J. Exp. Bot.*, 27, 1233–1241.

- Young I. M. 1995. Variation in moisture contents between bulk soil and the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. cv. New Phytol 130, 135–139
- Zahran, H. H. 1991. Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. Biol. Fertil. Soils 12, 73–80.
- Zahran, H. H., Sprent, J. I., 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta 167, 303–309.
- Zahran, H.H., 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63, p. 968-989.
- Zbiral. 2016. Determination of plant available micronutrients by the Mehlich 3 soil extractant - proposal of critical values. Plant soil environment 62, 527-531.
- Zhang, Z. Q., Shu, W.S., Lan, C.Y., and Wong, M. H. 2001. Soil seed bank as an input of seed sources in vegetation of lead/ zinc mine tailings. Restoration Ecology 9, 1-8.
- Zhao, J., Wang, X., Wang, X., Fu, S., 2014. Legume-soil interactions: legume addition enhances the complexity of the soil food web. Plant Soil 385, 273–286.