

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tine PALČIČ

**MIKOTROFNI STATUS AMERIŠKE BOROVNICE
(*Vaccinium corymbosum* L.) NA PRIDELOVALNIH
POVRŠINAH LJUBLJANSKEGA BARJA**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tine PALČIČ

**MIKOTROFNI STATUS AMERIŠKE BOROVNICE (*Vaccinium
corymbosum* L.) NA PRIDELOVALNIH POVRŠINAH
LJUBLJANSKEGA BARJA**

MAGISTRSKO DELO

**MICROTROPHICAL STATUS OF NORTHERN Highbush
BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) ON LJUBLJANA
MARSHES PRODUCTION AREA**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 24. 02. 2014 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja agronomije. Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Ireno Maček.

Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko, Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poskus je bili izveden v nasadih podjetja Jele Kitt d.o.o., na Ljubljanskem barju.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Irena MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Stanislav TOJNKO
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tine Palčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 634.737:631.466:577.2(043.3)
KG	Ameriška borovnica/erikoidna mikoriza/endofitske glive/DNK/Ljubljansko barje
AV	PALČIČ, Tine, univ. dipl. ing. agr.
SA	MAČEK, Irena (mentorica)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje agronomija
LI	2016
IN	MIKOTROFNI STATUS AMERIŠKE BOROVNICE (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) NA PRIDELOVALNIH POVRŠINAH LJUBLJANSKEGA BARJA
TD	Magistrsko delo
OP	XI, 70, [5] str., 11 pregl., 13 sl., 71 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Nasadi visokogrmovnate ameriške borovnice (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.), se hitro širijo po območju naravnega rezervata Ljubljansko barje. Razmere so tu primerne za pridelavo ameriške borovnice, ki ji ustrezajo kislota šotna tla, visoka raven podtalnice in primerno podnebje. Na zaščitenem območju Ljubljansko barje, kjer so nasadi ameriške borovnice različne starosti, ni podatkov o diverziteti in sezonski dinamiki endofitskih gliv ali potencialnega vnosa tujerodnih gliv v ta sistem z uvozom novih sadik. V nalogi smo vzorčili korenine ameriške borovnice pri novo uvoženih sadikah in v dveh nasadih, starih 18 in 30 let. V slednjih smo vzorčili v oktobru 2013, ter v aprilu in juniju 2014, da bi preučili sezonsko dinamiko sestave združb endofitskih gliv na tem področju in vpliv fitofarmacevtskih sredstev na sestavo združb. Iz opranih korenin smo ekstrahirali DNK, ter uporabili nabor molekularnih metod za karakterizacijo glivnih združb v izolatih, ki so v grobem zajemale pomnoževanje molekulskih markerjev regije ITS z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), z uporabo začetnih oligonukleotidov ITS1F in ITS4R ter pripravo klonskih knjižnic. V drugem delu poskusa smo spremljali vpliv fitofarmacevtskih sredstev (FFS), gnojenja in vrste inokuluma na število in dolžino poganjkov sort 'Duke', 'Darrow' in 'Elliott'. Rezultati so pokazali, da nove sadike, ki smo jih uvozili iz Italije, niso bile mikorizirane in zato niso vir potencialnih tujerodnih glivnih taksonov na tem področju. Ugotovili smo tudi, da so vsi taksoni gliv, ki smo jih potrdili v tej študiji saprofiti iz debla Basidiomycota in da so združbe gliv v različno starih nasadih ameriške borovnice statistično različne. Rezultati drugega dela so pokazali, da FFS nimajo vpliva na število in dolžino poganjkov in da sta vpliv gnojenja in vrste glivnega inokuluma na število poganjkov sortno specifična. To delo je prvi opis raznolikosti in sezonske dinamike sestave združb gliv v koreninah ameriške borovnice na zavarovanem območju Ljubljansko barje in tudi na območju Slovenije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 634.737:631.466:577.2(043.3)
CX Highbush blueberry/ericoid mycorrhiza/endophytes/DNA/Ljubljana Marshes
AU PALČIČ, Tine
AA MAČEK, Irena (supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Agronomy
PY 2016
TI MICROTROPICAL STATUS OF NORTHERN Highbush BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.) ON LJUBLJANA MARSHES PRODUCTION AREA
DT M. Sc. Thesis
NO XI, 70, [5] p., 11 tab., 13 fig., 71 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantations are rapidly spreading on the Ljubljana Marshes nature reserve area. Environmental conditions are suitable for blueberry production, including acidic peat soil, high groundwater level and suitable climate. There is no existent data on the diversity and seasonal dynamics of the communities of endophytic fungi or the potential input of the non-indigenous fungi into this system with the newly imported seedlings. We sampled blueberry roots of the newly imported seedlings, and in two blueberry plantations aged 18 and 30 years in October 2013, and in April and June 2014 in order to study seasonal dynamic of endophytic fungal communities in this area and the impact of plant protection products on their communities. DNA was extracted from washed and homogenised roots, followed by ITS region amplification with polymerase chain reaction (PCR), using ITS1F and ITS4R primers, and preparation of clone libraries. In the second part we measured the impact of plant protection products (PPP), fertilization and inoculum type on the number and length of shoots of three blueberry cultivars: 'Duke', 'Darrow', and 'Elliott'. Our data have shown that the roots of the new seedlings, imported from a producer in Italy, are not colonised with fungi and are therefore not a potential source of allochthonous fungal taxa in this area. All the fungal taxa, confirmed in this study, belonged to the phylum Basidiomycota. The fungal community composition differed between 18- and 30-year old blueberry plantations. The results of the second part showed that the PPP application did not influence the number and length of shoots. In addition, the impact of fertilisation and inoculum type on the number of shoots were cultivar specific. This work describes for the first time diversity and seasonal dynamics of highbush blueberry root fungi in the Ljubljana Marshes reserve area as well as in Slovenia.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN MAGISTRSKE NALOGE	1
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 LJUBLJANSKO BARJE	2
2.2 PRIDELAVA AMERIŠKE BOROVNICE NA LJUBLJANSKEM BARJU	3
2.3 ERIKOIDNA MIKORIZA	5
2.4 FIZIOLOŠKI UČINKI ErM	6
2.5 INOKULACIJA	8
2.6 UPORABA INOKULUMA V SADJARSTVU	10
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 POSKUS V TRAJNIH NASADIH AMERIŠKE BOROVNICE NA LJUBLJANSKEM BARJU	12
3.1.1 Opis nasadov	12
3.1.2 Vzorčenje v nasadu	16
3.1.3 Priprava vzorcev po vzorčenju	19
3.1.4 Molekulske analize erikoidnih mikoriznih združb v nasadih ameriške borovnice na ljubljanskem barju	20
3.1.4.1 Izolacija DNK	20
3.1.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	21
3.1.4.3 Agarozna elektroforeza	22
3.1.4.4 Čiščenje produktov PCR iz gela	23
3.1.4.5 Priprava knjižnic genov ITS rRNK	23
3.1.4.6 Sekvenciranje	25
3.1.5 Kolonizacija korenin ameriške borovnice z ErM glivami	25
3.1.6 Bioinformatika in statistična analiza podatkov za poskus v nasadu ameriške borovnice	26
3.2 LONČNI POSKUS	27
3.2.1 Zasnova poskusa	27
3.2.2 Meritve števila in dolžine poganjkov na rastlinah iz lončnega poskusa	30

3.2.3	Bioinformatika in statistična analiza podatkov za lončni poskus	31
4	REZULTATI	32
4.1	POSKUS V NASADU	33
4.2	LONČNI POSKUS	38
4.2.1	Primerjave povprečnih vrednosti za število poganjkov po datumih vzorčenja	38
4.2.2	Primerjave povprečnih vrednosti za dolžino poganjkov po datumih vzorčenja	43
4.2.3	Vpliv fitofarmacevtskih sredstev, tipa inokuluma in tipa gnojenja na število poganjkov	47
4.2.4	Vpliv fitofarmacevtskih sredstev, gnojenja in inokuluma na dolžino poganjkov	48
5	RAZPRAVA	49
5.1	SESTAVA ZDRUŽB ERIKOIDNIH MIKORIZNIH GLIV V KORENINAH AMERIŠKE BOROVNICE NASADIH NA LJUBLJANSKEM BARJU	49
5.2	VPLIV FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV NA DIVERZITETO MIKORIZNIH GLIV	52
5.3	VPLIV UPORABE INOKULUMA IN GNOJENJA NA RAZVOJ POGANJKOV	53
5.3.1	Število poganjkov	53
5.3.2	Dolžina poganjkov	54
6	SKLEPI	56
7	POVZETEK (SUMMARY)	59
7.1	POVZETEK	59
7.2	SUMARRY	61
8	VIRI	64
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Načrt vzorčenja po številu odvzetih vzorcev na obeh lokacijah v letih 2013 in 2014. Vzorčene so bile korenine pri grmih ameriške borovnice (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) sorte 'Bluecrop', ki so bili normalno tretirani s FFS in pa kontrolni grmi, ki so bili zaščiteni s folijo. Tretiranje je potekalo spomladi in poleti 2014. Kontrolne sadike so bile kupljene v Italiji.	17
Pregl. 2: Fotografije grmov in lokacij vzorčenja v času vzorčenja.	18
Pregl. 3: Zasnova poskusa po obravnavanjih za vsako sorto.	28
Pregl. 4: Datumi vzorčenja števila in dolžine novih poganjkov pri lončnem poskusu.	31
Pregl. 5: Število sekvenc gliv po posameznih vzorcih (V- pomeni vzorec) po času vzorčenja in po lokaciji vzorčenja. Kontrola so grmi zaščiteni pred FFS.	33
Pregl. 6: Število sekvenc po klasifikaciji gliv in bakterij.	34
Pregl. 7: Klasifikacija sekvenc glede na čas vzorčenja za obe lokaciji.	35
Pregl. 8: Podatki o številu poganjkov za posamezno obravnavanje (Rhodovit [®] , brez inokuluma in gozdni inokulum). Prikazani so podatki o gnojenju, o sortah in datum vzorčenja. Podane vrednosti so povprečja $\pm$ standardni odklon. Povprečne vrednosti v istem stolpcu brez enake skupne črkovne oznake (a, b, c) so med seboj statistično različne ($P < 0,05$; test mnogoterih primerjav Tukeyevi kontrasti).	41
Pregl. 9: Podatki o dolžini poganjkov za posamezno obravnavanje (Rhodovit [®] , brez inokuluma in gozdni inokulum). Prikazani so podatki o gnojenju, o sortah in datum vzorčenja. Podane vrednosti so povprečja $\pm$ standardni odklon in število meritev (n). Povprečne vrednosti v istem stolpcu brez enake skupne črkovne oznake (a, b, c) so med seboj statistično različne ($P < 0,05$; test mnogoterih primerjav Tukeyevi kontrasti).	45
Pregl. 10: Podane so P vrednosti ('***' $P < 0,001$, '**' $P < 0,01$, '*' $P < 0,05$) za vpliv gnojenja in vpliv inokuluma na število poganjkov po datumih vzorčenja za posamezno sorto (večsmerna ANOVA). V primeru, da ni oznake, pomeni to, da statistično značilnih razlik med obravnavanji ni.	47
Pregl. 11: Podane so P vrednosti ('***' $P < 0,001$, '**' $P < 0,01$, '*' $P < 0,05$) za vpliv gnojenja in vpliv inokuluma na dolžino poganjkov po datumih vzorčenja za posamezno sorto (večsmerna ANOVA). V primeru da ni oznake, statistično značilnih razlik med obravnavanji ni.	48

KAZALO SLIK

- Sl. 1: Svetlo rjave označene površine (oznaka 1221), predstavljajo intenzivne sadovnjake (na sliki ameriške borovnice). Označeni sta tudi lokaciji vzorčenja v sklopu tega dela (GERK, 2015). 3
- Sl. 2: Lokaciji vzorčenja korenin grmov ameriške borovnice sorte 'Bluecrop', v dveh nasadih različne starosti na Ljubljanskem barju. Lokacija 1 je nasad, ki je star 30 let, lokacija 2 je nasad star 18 let (Google Maps, 2015). 14
- Sl. 3: Slika prikazuje zasnovo vzorčenja korenin pri ameriški borovnici sorte 'Bluecrop' v obeh nasadih starosti 30 (lokacija 1) in 18 let (lokacija 2). Z rdečo barvo so označeni vzorčeni grmi, ki so bili normalno tretirani s FFS. Z rumeno so označeni vzorčeni grmi, ki so bili skupaj s tlemi okoli njih zaščiteni s folijo in predstavljajo kontrolne grme. 16
- Sl. 4: Lokacija nabiranja inokuluma v obliki rizosfernih tal navadne gozdne borovnice (*Vaccinium myrtillus*) za potrebe lončnega poskusa (Google Maps, 2015). 29
- Sl. 5: Korenine kupljenih sadik ameriške borovnice sorte 'Bluecrop', 'Duke', 'Darrow' in 'Elliott' pod mikroskopom (korenine niso kolonizirane z ErM glivami (slika c), na sliki a, b in d so vidne hife gliv, ki jih nismo mogli indetificirati). Na vseh štirih slikah je tudi nerazbarvan lignin. 32
- Sl. 6: Filogenija gliv vzorčenih na lokaciji 1 (30 let) in lokaciji 2 (18 let) na območju Ljubljanskega barja. Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distančne metode združevanja najbližjega sosedu («neighbor joining»). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja («bootstrap values») s 10.000 permutacijami. S temno rdečo barvo so označeni vzorci (V6, V7, V8, V9) jesenskega vzorčenja (oktober) (30 let), z oranžno barvo so označeni vzorci (V11, V13) jesenskega vzorčenja (oktober) (18 let), s temno zeleno barvo je označen vzorec (V52) spomladanskega vzorčenja (april) (30 let), s svetlo zeleno barvo vzorci (V41, V42) spomladanskega vzorčenja (april) (18 let), s temno modro barvo je označen vzorec (V58) poletnega vzorčenja (junij) (30 let) in s svetlo modro so označeni vzorci (V68, V69) poletnega vzorčenja (junij) (18 let). Odebeljeno besedilo predstavlja vzorce (V48, V63, V72), ki niso bili škropljeni in predstavljajo kontrolne grme spomladanskega in poletnega vzorčenja. 36
- Sl. 7: Ordinacijski graf nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja prikazuje razporeditev jesenskih vzorcev iz 30 (lokacija 1) in 18 let starega nasada (lokacija 2) v dve značilno različni skupini, razen enega vzorca, ki je bližje vzorcem iz 18 let starega nasada (lokacija 2). 37
- Sl. 8: Slika prikazuje število poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Darrow'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi je prikazano število poganjkov. 39
- Sl. 9: Slika prikazuje število poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Duke'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013,

10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi je prikazano število poganjkov. 39
- Sl. 10: Slika prikazuje povprečno število poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Elliott'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi je prikazano število poganjkov. 40
- Sl. 11: Slika prikazuje dolžine poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Darrow'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi so prikazane dolžine poganjkov. 43
- Sl. 12: Slika prikazuje dolžine poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Duke'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi so prikazane dolžine poganjkov. 44
- Sl. 13: Slika prikazuje dolžine poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Elliott'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi so prikazane dolžine poganjkov. 44

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

Analiza tal za lokacijo vzorčenja 1 (nasad 30 let).

PRILOGA B

Analiza tal za lokacijo vzorčenja 2 (nasad 18 let).

PRILOGA C

Poročilo k analizam tal.

PRILOGA Č

Tehnična specifikacija kupljenega inokuluma Rhodovit[®] (Symbiom, Republika Češka).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AM	arbuskularna mikoriza / arbuskularne mikorizne
Amp	ampicilin
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ErM	erikoidna mikoriza / erikoidne mikorizne
FFS	fitofarmacevtska sredstva
ITS	notranji prepisni vmesnik (internal transcribed spacer)
MOS	mešanica šote in vermikulita
NPK	gnojilo z dušikom, fosforjem in kalijem
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
OTU	operativna taksonomska enota
T-RFLP	dolžinski polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov (terminal restriction fragment length polymorphism)
NMDS	nemetrično večrazsežnostno lestvičenje

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN MAGISTRSKE NALOGE

Na Ljubljanskem barju se nasadi ameriške visokogrmovnate borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) dandanes zelo širijo zaradi primernih razmer, ki jih predstavljajo kislota, visoka podtalnica in primerni podnebni dejavniki. Ameriška visokogrmovnata borovnica sodi v družino vresovk (Ericaceae). Za svojo nemoteno rast, poleg zgoraj naštetih dejavnikov, nujno potrebuje kolonizacijo korenin z erikoidnimi mikoriznimi glivami, ki izboljšajo absorpcijo hranil iz tal, predvsem amonijske oblike dušika.

Kljub hitremu širjenju nasadov pa ni dosti znanega o tem, kako pride do mikorizacije korenin rastlin oz. kako dolgo traja, da se vzpostavi simbioza med rastlinami in erikoidnimi mikoriznimi glivami, ko zasadimo novo sadiko. Zelo malo je znanega o tem, kdaj sploh pride do prve inokulacije korenin z erikoidnimi mikoriznimi glivami, ali so te prisotne v novo nastalih nasadih ter kakšna je mikorizacija kupljenih sadik. Prav tako ni podatkov o diverziteti in sestavi združb erikoidnih mikoriznih gliv v različno starih nasadih ameriške borovnice na Ljubljanskem barju ter o tem, kako različni agrotehnični ukrepi (npr. uporaba pesticidov) vplivajo na erikoidno mikorizo.

Namen raziskave je bil dvojen; (1) raziskati, kaj je primarni vir diverzitete mikoriznih gliv v koreninah ameriške borovnice, ki raste v nasadih na Ljubljanskem barju (kupljene sadike, glive, že prisotne v nasadih), (2) spremljati rast in razvoj kupljenih sadik ameriške borovnice, ki so bile inokulirane z erikoidnimi mikoriznimi glivami v obliki inokuluma, v odvisnosti od gnojenja in uporabe fitofarmacevtskih sredstev.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

H1: V koreninah rastlin ameriške borovnice iz različno starih nasadov je pestra sestava združb endofitskih gliv, ki se med različno starimi nasadi razlikuje.

H2: Škropljenje rastlin s pripravkoma Score 250 EC in Switch 62,5 WG negativno vpliva na diverzitetu mikoriznih gliv v koreninah ameriške borovnice.

H3: Kupljene sadike ameriške borovnice ob nakupu niso mikorizirane, zato se bolje razvijajo, če jih okužimo z inokulumom, ki vsebuje propagule erikoidnih mikoriznih gliv. Na razvoj sadik pa vplivata tudi gnojenje in uporaba fitofarmacevtskih sredstev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LJUBLJANSKO BARJE

Ljubljansko barje je eno izmed najbolj znanih šotnih barij v Sloveniji, katerega so že od nekdaj izkoriščali za kmetijsko rabo. Z izsuševanjem in kmetijsko uporabo šotnih tal je pospešena tudi mikrobna razgradnja organske snovi, kar navadno vodi do tanjšanja šotne plasti, zmanjšanja plodnosti tal in zaradi posedanja ob obilnem deževju, do ponovnega poplavljanja površin.

V 20. stoletju se je podoba Barja zaradi intenzivne kmetijske rabe tal in intenzivnega rezanja šote povsem spremenila. Leta 1980 je bilo razmerje med močvirskimi travniki in obdelovalnimi površinami 10:1, leta 1992 pa 3:2 (Trilar, 2001). Pomanjkanje hranilnih snovi in kisika, velika kislost in vsebnost huminskih kislin, omogočajo nastajanje šote iz globljih odmrlih delov šotnega mahu in pa življenje zelo specializiranim rastlinam in živalim, ki bi jih v ugodnejših rastihi razmerah izpodrinile druge (Trilar, 2001). V geografskem prostoru ima pomembne okoljske funkcije, kot so zadrževanje padavinske vode, in s tem preprečevanje erozije, zbiranje talne vode, ki je vir pitne vode, in deluje kot naravni čistilni sistem za vodo in tla. Vrhnja plast tal Ljubljanskega barja, ki po podatkih obsega približno 110 km² površin pokritih s šoto (Trilar, 2001), vsebuje 20-60 % organske snovi, kar je značilno za rodovitna tla, medtem ko je za spodnje plasti značilna nerazgrajena ali delno razgrajena šota (Hacin in sod., 2001). V Tomišlju so preučevali vpliv nivoja podtalnice in količine organskega materiala na mikrobno mineralizacijo in ugotovili, da je mineralizacija organskega N sorazmerna s količino organske snovi v tleh, ter da je najhitrejšo mineralizacijo pričakovati, ko je višina podtalnice 40-60 cm pod površjem (Hacin in sod., 2001).

Ljubljansko barje je od leta 2004 v območju Natura 2000. Pravno podlago za vzpostavitev območja predstavljata evropski Direktiva o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst (Council directive 92/43/EEC, 1992) in Direktiva o ohranjanju prostoživečih ptic (Council directive 79/409/EEC, 1979). Zakonsko osnovo v Sloveniji pa predstavljajo: Zakon o ohranjanju narave (2004), Uredba o posebnih varstvenih območjih (območjih Natura 2000) (2004), Uredba o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah (2004), Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah (2004), Uredba o habitatnih tipih (2003).

2.2 PRIDELAVA AMERIŠKE BOROVNICE NA LJUBLJANSKEM BARJU

Po podatkih Statističnega urada Republike Slovenije je bilo v Sloveniji do leta 2012, nasajenih 58.529 sadik ameriške borovnice na bruto površini 27,1 ha (Statistični urad Republike Slovenije, 2012). Prvi nasadi ameriške sadne vrste, visokogrmovnate borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.), so bili na borovniškem delu Ljubljanskega barja med gradom Bistra in Borovniščico zasnovani jeseni leta 1984. Danes so v Borovnici pri Vrhniku največji nasadi borovnic v Sloveniji, preko 20.000 grmov na površini okrog 15 hektarjev (Analiza stanja ..., 2009).

Na spodnji sliki so po barvah in številkah prikazani tipi rabe tal, ki se pojavljajo na Ljubljanskem barju na območju nasadov, ki so del naše raziskave. Svetlo rjave označene površine z oznako 1221 predstavljajo intenzivne sadovnjake (v tem primeru ameriške borovnice). Uporabljeni so sloji Raba tal, GERK in Orto-foto (GERK, 2015). Na sliki sta označeni tudi lokaciji vzorčenja.



Legenda: svetlo rjava (1221)-intenzivni sadovnjak, svetlo zelena (1321)-barjanski travnik, rjava (1100)-njiva oz. vrt, zelena (1300)-trajni travnik, temno zelena (1500)-drevesa in grmičevje, temno zelena (1410)-zemljišče v zaraščanju, temno zelena (1600)-neobdelano kmetijsko zemljišče, 3000-pozidano in sorodno zemljišče.

Slika 1: Svetlo rjave označene površine (oznaka 1221), predstavljajo intenzivne sadovnjake (na sliki ameriške borovnice). Označeni sta tudi lokaciji vzorčenja v sklopu tega dela (GERK, 2015).

Figure 1: The light brown marked area (mark 1221), represent the intensive orchard (on the figure are highbush blueberry orchards). The two locations of the sampling within this work are marked on the figure (GERK, 2015).

Ameriška borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) je sadna rastlina iz skupine jagodičja. Taksonomsko borovnice razvrščamo v družino Ericaceae (vresovke) in rod *Vaccinium* (vakcinij). Vresovke so obsežna kozmopolitska družina manjših dreves, grmov in polgrmov in le redko zelišč. Obsega okrog 100 rodov in 3000 vrst. Najobsežnejša rodova sta *Rhododendron* – sleč (1200 vrst) in *Erica* – resa (preko 500 vrst). Večina vrst raste v ekstremnih talnih razmerah (zelo kislja šotna tla, zelo zamočvirjena šotna tla, zelo suha, na humusu revna tla) z značilno erikoidno mikorizo (Batič in sod., 2004).

V Severni Ameriki samoniklo rastejo številne vrste borovnice. Glede na habitus grma jih razvrščamo v tri skupine: visoko grmovnate (npr. *Vaccinium corymbosum* L.), nizko grmovnate (npr. *Vaccinium angustifolium* Ait.) in orjaške borovnice (npr. *Vaccinium virgatum*, znane tudi kot *V. ashei*). V Evropi rastejo samo štiri samonikle predstavnice rodu *Vaccinium* in sicer gozdna borovnica (sin. črnica) (*Vaccinium myrtillus* L.), brusnica (*Vaccinium vitis-idaea* L.), barjanska kopišnica (*Vaccinium uliginosum* L.) in drobnolistna kopišnica (*Vaccinium gaultherioides* Bigelow) (Martinšič in sod., 2010). Plodovi kopišnice so modre barve s poprhom. Plodovi so užitni, vendar so plehkega okusa. Pri nas so zanimive samo iz botaničnega vidika. Nizkogrmovnata borovnica (*Vaccinium angustifolium*) samoniklo raste v Ameriki in jagode te rastline nabirajo kot pri nas gozdne borovnice, sicer pa se uporabljajo v žlahtnjenju (Oblak, 1996).

Ameriška borovnica (*Vaccinium corymbosum* L.) je večletni grm, ki tipično zraste od 1,5 do 3 m visoko, včasih tudi višje. Plodovi so nekajkrat debelejši kot pri navadni gozdni borovnici (*Vaccinium myrtillus* L.), vendar so manj aromatični. Imajo dvakrat več suhe snovi in sladkorja ter enako ali celo več vitamina C, imajo pa manj antocianov kot navadna gozdna borovnica. Jagode so temno modre barve s poprhom, sladko-kislega okusa, meso v notranjosti ploda je zelenkaste barve. Postopoma zorijo do pet tednov. Visokogrmovnata ameriška borovnica uspeva na sončnih legah, le v kisljih (pH je 3,8–5,0) s humusom bogatih tleh. Ameriška borovnica je kalcifobna rastlina, ki se od kalcifilnih rastlin razlikuje po manjši potrebi po kalciju in na tleh, bogatih s tem mineralnim hranilom, ne uspeva dobro. Ima zelo majhne potrebe po hranilih in je na preveliko količino hranil v tleh zelo občutljiva. Razen Fe, Cu in S, potrebuje manj hranil kot druge sadne vrste. Dušik sprejema v amonijevi obliki in ne v nitratni, kot večina kmetijskih rastlin (Oblak, 1996).

Ameriška borovnica se od večine ostalih sadnih rastlin zmerne pasu bistveno razlikuje v zgradbi in delovanju koreninskega sistema, ki je v obliki grude, sestavljen iz gosto prepletenih korenin brez glavne korenine, kar je sicer značilno za vse vresovke. Večje korenine dosežejo debelino 3–10 mm (Gough, 1980). Koreninski sistem pri ameriški borovnici je izredno plitev, nekje do globine 80 cm. Glavnina korenin je med 20 in 30 cm pod površjem, sestavljajo jo tanke, vlaknate korenine premera 50 µm do 2 mm, ki skrbijo za prehrano rastline (Read in Kerley, 1995). Korenine ameriške borovnice rastejo vse

leto, ko je temperatura v tleh od 8–20 °C (optimalna temperatura med 14–18 °C) (Oblak, 1996). Tudi Spiers (1995) je v svoji študiji v rastlinjaku spremljal rast korenin in poganjkov različnih klonov *V. corymbosum* in *V. ashei* pri nihanju temperature. Ugotovil je, da je rast korenin in poganjkov odvisna od temperature in da najbolje rastejo pri temperaturi substrata 16 °C (Spiers, 1995). Korenine ameriške borovnice in tudi drugih vresovk imajo še to posebnost, da se vanje naselijo erikoidne mikorizne glive, ki oskrbujejo rastlino s potrebnimi hranili (Oblak, 1996).

2.3 ERIKOIDNA MIKORIZA

Povezave med različnimi organizmi, kot npr. med glivo in algo v lišaju, rastlino in glivo v mikorizi ter med bakterijami in rastlinami pri simbiotski fiksaciji dušika, imajo v naravnih ekosistemih in ekosistemih, ki jih je oblikoval človek, zelo pomembno vlogo. Mikoriza je simbioza, ki temelji na medsebojni izmenjavi hranil med rastlinami in mikoriznimi glivami (Smith in Read, 2008).

Pri vrstah iz rodu *Vaccinium* so povezavo med glivami in rastlinami opazili v začetku 20. stoletja. Leta 1908 so v koreninah številnih rastlin iz rodu *Vaccinium* opazili glive in ugotovili, da je bujnost rastlin odvisna od kolonizacije korenin z glivami. Leta 1910 so že poročali o mikorizi na koreninah ameriške borovnice (Goulart in sod., 1993). Značilne zvitke hif v celicah koreninske skorje ameriške borovnice, je leta 1959 J. L. Harley poimenoval erikoidna mikoriza. Leta 1988 so s poskusi ugotovili, da nitratna oblika dušika zavira razvoj mikorize, medtem ko jo amonijeva oblika pospešuje (Kerley in Read, 1995).

Erikoidno mikorizo (ErM) vzpostavijo rastline z glivami iz debla Ascomycota. Le majhno število gliv je bilo do sedaj identificiranih kot tipične erikoidne mikorizne glive. Daleč najbolj raziskana in znana je vrsta glive *Hymenoscyphus ericae*, ki je kot kaže prevladujoča vrsta, ki tvori erikoidno mikorizo v Evropi. Erikoidne mikorizne glive so omejene le na kolonizacijo rastlin iz družine Ericaceae (vresovke). ErM glive so sposobne prehajanja iz saprofitskega v simbiotski način življenja. ErM glive so lahko bolj razširjene kot rastline v simbiozi z ErM, ker so sposobne preživeti kot saprofiti ali pa kot mirujoče oblike v bližini korenin nemikoriznih rastlin. Pri vzpostavitvi mikorize z rastlinami ne tvorijo encimov, ki razgadi celično steno, tako kot naredijo v saprofitskem načinu prehranjevanja (Koron, 2008). V primerjavi z drugimi tipi mikorize, npr. arbuskularnimi mikoriznimi (AM) glivami in ektomikoriznimi glivami, ErM glive razvijejo zelo majhen zunajkoreninski micelij (Smith in Read, 2008).

Glive iz rodu *Oidiodendron* so lahko simbionti ali pa tudi saprofiti. Najdemo jih predvsem v gozdnih tleh z veliko humusa. Nekatere so zelo podobne ektomikoriznim glivam, ki jih najdemo pri iglavcih in tudi drugih vrstah kritosemenk, vendar kljub temu tvorijo zelo

podobne strukture kot *Hymenoscyphus ericae*. Gliva *Oidiodendron griseum* izolirana iz ektomikoriznih korenin bukve ne vzpostavi erikoidne mikorize s sejanci *Vaccinium*. Gliva *Oidiodendron citrinum*, prav tako izolirana iz istega drevesa, pa je z ameriško borovnico vzpostavila mikorizo. Iz tega je razvidno, da so odnosi med glivo in rastlino zelo specifični (Perotto in sod., 1995).

Ker imajo nekatere ErM glive sposobnost preživeti kot saprofit, je ta sposobnost uporabna za gojenje na gojiščih, ker glive izločajo encime, kot so kisle fosfataze in karboksiproteinaze, ki so odločilnega pomena pri razgradnji in sprejemanju hranil iz tal za mikorizne rastline. Njihovi encimi lahko razgradijo celo sestavine celičnih sten, kot so tanini, hitin in lignin (Perotto in sod., 1995).

Korenine ameriške borovnice nimajo razvitih tankih koreninskih laskov, ki jih ima večina visoko razvitih rastlin. Vlogo koreninskih laskov na vlaknatih koreninah prevzamejo hife erikoidnih mikoriznih gliv (ErM), ki rizodermalne celice rastline prerastejo z razvejanimi spleti hif. Hife ErM gliv se preko vlaknatih korenin razrastejo v ohlapno mrežo. Hife kolonizirajo vrhno plast celic in ne prodrejo v centralni cilinder ali meristemsko tkivo. V posamezni celici tvorijo klobčiče hif, ki jih rastlinska celica obda s plazmalemo in s tem prepreči, da bi se le te razširile po celotni korenini. Približno 4 tedne po inokulaciji postanejo koreninske celice kolonizirane. Kolonizacija rastlin v substratih bogatih s hranili je počasnejša in traja od šest do sedem tednov. Stopnja kolonizacije pada obratno sorazmerno z večanjem količine dušika v substratu (Koron, 2008). ErM glive vstopajo v korenine rastlin na številnih vhodnih mestih ($250\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ dolžine korenine), tako, da je povezava med zunajkoreninskim micelijem in micelijem v koreninah rastlin zelo dobra. Zunanji micelij ErM gliv se razvije le od 0,5 do 1 cm daleč od korenine gostiteljske rastline. Pri EM najdemo mnogo več hif znotraj koreninskih celic, kot zunaj njih (Read, 1984). ErM se razvija znotraj vsake posamezne celice in se nikoli lateralno ne povezuje s sosednjimi celicami, tako da posamezna celica predstavlja samostojno, s spleti hif kolonizirano enoto (Gianinazzi-Pearson in Bonfante-Fasolo, 1996).

2.4 FIZIOLOŠKI UČINKI ErM

Kot je ponavadi značilno za obdelana kmetijska tla, se v procesu razgradnje hranil v tleh vršita mineralizacija in nitrifikacija, ki naredita hranila dostopna večini kmetijskih rastlin. V kislih tleh je mineralizacija skoraj zaustavljena in tudi nitrifikacija se ne vrši zaradi pomanjkanja kisika in visoke talne vode. Zato tukaj nastopijo ErM glive, ki lahko s svojimi encimi pretvorijo kompleksne molekule N, C in P, ki sestavljajo organsko snov, do oblik, ki so dostopne rastlinam. Na vresiščih tvorijo ErM glive encime, kot so hitinaze, lignaze, proteinaze, itd, ki so ključnega pomena za rastline iz tega obočja (Koron, 2008).

Sposobnost ErM gliv, da hidrolizirajo in asimilirajo nukleinske kisline, proteine in hitin, prispeva k uspehu mikoriznih rastlin na kisljih organskih tleh (Kerley in Read, 1995).

Eden prvih poskusov sprejemanja N pri rodu *Vaccinium*, sta izvedla Strybley in Read (1974, cit. po Koron, 2008), ki sta mikoriziranim in nemikoriziranim rastlinam v sterilnem substratu, dodajala amonijsko obliko dušika. Ugotovila sta, da so nemikorizirane sprejele več amonijske oblike N, medtem ko so mikorizirane sprejele več N iz organske snovi (substrata). Ker ni nitrifikacije, predstavlja organska snov edini vir N. Nekatere ErM glive imajo sposobnost preživeti kot saprofit (npr. *Hymenoscyphus ericae*), tako da izkoriščajo N v oblikah aminokislin, peptidov, v amonijski in nitratni obliki, v obliki prostih proteinov in proteinov v povezavi s tanini (Bajwa in Read, 1985, cit. po Koron, 2008; Read, 1996, cit. po Koron, 2008). Nekatere raziskave so dokazale, da lahko ErM glive izrabljajo tudi hitin in mrtev micelij. V šotnih tleh na rastiščih jesenske vrese (*Caluna vulgaris* L.) sta Kerley in Read (1997, cit. po Koron, 2008) ugotovila, da je v okolici korenin od skupnega N, 30 % N iz hitina, v zgornji plasti šote pa 22 %. To dokazuje, da lahko iz odmrlega micelija dobijo ErM glive zalogo N, ki ga tako ohranjajo v tleh.

Smith in Read (2008) v svoji knjigi navajata zbrane starejše študije o tem (Burke in Cairney, 1998; Cairney in Burke, 1998; Bending in Read, 1997; Kerley in Read, 1995; Mitchell in sod., 1992; Leake in Read, 1990), da je ErM gliva *Rhizoschyphus ericae* sposobna razgrajevati pektine, celulozo, celobiozo, hemicelulozo, ki so glavne sestavine celičnih sten rastlin. V nekaterih primerih poročajo tudi, da lahko z oksidacijo razgradi tudi tanine. Nekateri znanstveniki so odkrili tudi, da lahko delno razgradi tudi lignin, do hidroksilnih radikalov, vendar ta mehanizem še ni čisto raziskan. V tem primeru so bolj pomembne lesne glive, ki povzročajo belo in rjavo gnilobo. Poleg teh materialov so kot pomemben vir N, na rastiščih vrese odkrili tudi hitin, ki predstavlja od 10-40 % celokupnega N. Gliva *R. ericae* ga lahko sprejme v obliki N-acetilglukozamina in N-acetilgalaktozamina ali pa ga razgradi v celoti. Ko so glivi *R. ericae* za rast dodali, kot edini vir N, očiščene delčke stene hif iz čistih kultur ErM in EcM gliv, so ugotovili, da jih gliva lahko uporabi za rast.

Veliko starejših študij, ki sta jih Smith in Read (2008) povzela v svoji knjigi (Bajwa in Read, 1985; Leake in Read, 1989; Leake in Read, 1990; Jennings, 1995), je že dokazalo, da ErM edofiti uporabljajo za rast razne preproste oblike N, vendar se čedalje več raziskuje in so velikega pomena raziskave, ki kažejo, da lahko za svojo rast uporabijo tudi bolj kompleksne oblike N, kot so peptidi, proteini, itd. Primer je dodajanje alanina in tripeptid glutationa kot edinega vira N in C ErM glivi *R. ericae*, ki uspešno predela te molekule. Sicer je asimilacija počasnejša, ker so bolj kompleksne molekule, končni rezultat je pa enak uporabi manj kompleksnih molekul ali amonijske oblike N. Ugotovili so tudi, da izločajo proteinaze, ki lahko razgrajujejo zelo kompleksne molekule npr. protein BSA, ki najbolje delujejo pri nizkem pH med 2 in 5.

Proteolitična aktivnost je zelo odvisna od prisotnosti proteinov samih ali njihovih razgradnih produktov. Do izločanja ekstracelularnih proteinaz pride, ko se v okolici ErM glive (*R. ericae*) pojavi primeren substrat, ki izzove tvorjenje in izločanje encimov. Ker se ta sistem razgradnje pojavlja v območju (kisla tla) tipičnem za rast ErM gliv, lahko višji pH in vsebnost sladkorja v intracelularnem okolju (v koreninah), zagotavlja, da do izločanja proteinaz v epidermalnih celicah ne bi prišlo (Smith in Read, 2008).

V neki novejši študiji so spremljali, kako koloniziranost korenin jesenske vrese (*Caluna vulgaris*) z *R. ericae* vpliva na transport hranil. Ugotovili so, da se je v koloniziranih celicah zelo povečal transport aminokislin asparagina, histidina, lizina in ornitina (Sokolovski in sod. 2002). Baywa in Read (1985, cit. po Smith in Read, 2008) sta poročala, da so pri koloniziranih sadikah grmov ameriške borovnice ob dodatku peptidov v rastlini izmerili povečan pridelek in višje vsebnosti N, kot pri neinokuliranih.

2.1 INOKULACIJA

Približno štiri tedne po inokulaciji postanejo koreninske celice kolonizirane. Kolonizacija rastlin v substratih, bogatih s hranili, je počasnejša in traja od šest do sedem tednov. Delež kolonizacije korenin z mikoriznimi glivami se znotraj nasada veča zelo počasi. Kot poroča Oblak (1996), je dve leti po sajenju okuženih ca 1/3 korenin, po petih letih ca 2/3 in šele po petnajstih letih 100 % korenin. To pojasnjuje zakaj borovnice tako pozno dosežejo končni obseg grma in polno rodnost (Oblak, 1996).

V svoji študiji so Boyer in sod. (1982) primerjali kolonizacijo korenin štirih sort ('Croatan', 'Jersey', 'Montague' in 'Wolcott') visokogrmovnate ameriške borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) iz pridelovalnih nasadov z avtohtono vrsto borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.) iz bližnjih rastišč. Ugotovili so, da je bil delež koloniziranih korenin z mikorizo pri ameriški borovnici iz pridelovalnih nasadov precej manjši (1–3 %) kot pri avtohtonih vrstah borovnic (85 %). V študiji ugotavljajo, da je majhen delež koloniziranih korenin v pridelovalnih nasadih verjetno posledica uporabe pesticidov in večjih količin hranilnih snovi v tleh.

V študiji Scagelove iz leta 2005 je bil izveden poskus kolonizacije korenin z glivami na sortah ameriške borovnice 'Bluecrop', 'Blueray', 'Darrow', 'Earlyblue', 'Georgiagem', 'Sparta' in 'Patriot'. Uporabili so tri vrste gliv, in sicer (1) glivo *Oidiodendron griseum*, izolirano iz korenin vrste *Vaccinium corymbosum*, (2) glivo *Pezizella ericae* iz korenin vresovk in (3) glivo *Hymenoscyphus ericae*, izolirano iz korenin vrste *Vaccinium angustifolium*. Ugotovila je, da sorta borovnice, tip gnojila in vrsta glive niso bistveno vplivali na kolonizacijo korenin z ErM glivami. Od sedmih opazovanih sort ameriške

borovnice so imele tri sorte močnejšo kolonizacijo z glivami, in sicer sorta 'Bluecrop' in 'Georgiagem', ki sta bili inokulirani z glivo *Oidiodendron griseum* in sorta 'Spartan', inokulirana z glivo *Pezizella ericae*. Rastline, ki so rastle v substratu z dodanim organskim gnojilom, so imele po večini večjo kolonizacijo korenin z glivami *O. griseum* in *P. ericae* kot rastline, ki so rastle v substratu z dodanim mineralnimi gnojili. Pri nekaterih sortah se je z inokulacijo z ErM glivami povečala biomasa listov, korenin in stebel (Scagel, 2005).

V starejših poskusih so na potaknjencih ameriške borovnice spremljali vpliv inokulacije na samo koreninjenje in rast samih potaknjencev. Lauren (1985, cit. po Koron, 2008) in Powell (1982, cit. po Koron, 2008) sta ugotovila, da kolonizacija ni vplivala na rast niti na koreninjenje potaknjencev. Tudi Powell in Bagyaraj (1984, cit. po Koron, 2008), sta dobila podobne rezultate, ko sta zelene potaknjence ameriške borovnice inokulirala s čisto kulturo *H. ericae* in z šoto iz naravnega rastišča borovnic. Ugotovila sta, da čisti inokulum ni vplival na rast potaknjencev, razen na povečanje inokulacije, medtem ko je pa naravni inokulum prispeval na malo boljšo rast in koreninjenje. Naravni inokulum ponavadi vsebuje več vrst gliv, ki lahko izločajo tudi hormone (npr. citokinine) in verjetno zato pripomore k boljši rasti. Naravne inokulume je v praksi zaradi možnega prenosa bolezni nevarno uporabljati, razen, če se uporablja izolirane glive iz domačega okolja. Tudi Litten (1992, cit. po Koron, 2008) je v svoji študiji odkril, da mešanica šote z dodanim naravnim inokulumom vpliva na boljši prirast, razvoj korenin, razvejanost in koloniziranost korenin, kot pri šoti brez inokuluma. Yang (1996, cit. po Koron, 2008) je v svoji študiji dobil pri nekaterih sortah podobne rezultate.

Silva in sod. (2000) so delali poskus na sadikah ameriške borovnice sorte Bluecrop, in sicer so ugotavljali kako različne bakterije in glive izolirane iz tal oz. korenin divjih borovnic na območju Arkansasa (Washington). Izolirali so bakterije *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas corrugata* in glive *Gliocladium virens* in *Trichoderma harzianum*. Pri glivi *Gliocladium virens* so tako v pasteriziranih in nepasteriziranih tleh (šota) dobili boljšo rast poganjkov, večjo listno maso, močnejše poganjke, kar nakazuje, da bi se lahko ta gliva uporabljala za okužbo sadik na novo zasnovanih nasadih ameriške borovnice.

Identifikacija mikoriznih gliv v koreninah rastlin igra odločilno vlogo pri razumevanju njihove ekološke niše v povezavi z rastjo rastline. Pomembno vlogo pri karakterizaciji tipa erikoidne mikorize ima uporaba kombinacije tehnik čistih kultur in sekvenciranja. Uvedba neposrednih tehnik sekvenciranja, kot je visokozmogljivostno sekvenciranje novih generacij (npr. Roche 454, Illumina MiSeq), je privedlo do odkritja večje raznolikosti mikoriznih gliv v koreninah rastlin različnih rodov vresovk, kot smo jih poznali pred uvedbo teh tehnologij v študijah ekologije (nekje pred letom 2008). Kombinacijo obeh tehnik (izolacije in gojenja čistih kultur ter naprednih molekularnih

metod) so uporabili v študiji iz Južne Afrike, kjer so raziskovali raznolikost združb gliv v koreninah rastlin iz roda *Erica*. Ugotovili so, da so v lasastih koreninah testiranih rastlin prevladovale glive iz redu Helotiales (rodovi: *Oidiodendron*, *Meliniomyces*, *Phialocephala*, *Cadophora*, *Leohumicola*) in nekatere neklasificirane skupine gliv. Z tehniko pirosekvenciranja (Roche 454) so dokazali večje število gliv iz debela Bazidiomycota, kar 27 % medtem ko so z metodo čistih kultur odkrili samo 3 % gliv iz debela Bazidiomycota. Z metodo pirosekvenciranja so v koreninah rastlin odkrili večjo diverziteto endofitskih gliv kot z gojitvenimi tehnikami, medtem ko je bila taksonomska uvrstitev pripadnosti rodu in vrsti bolj natančna pri metodi čistih kultur. Zaključek študije je bil, da simultana uporaba obeh metod (klasičnih gojitvenih tehnik in naprednih metod sekvenciranja) pripomore k boljši karakterizaciji združb erikoidnih mikoriznih gliv, kot uporaba posamezne metode (Bizabani in Dames, 2015a).

2.2 UPORABA INOKULUMA V SADJARSTVU

Ker se znanost zelo hitro razvija, je na tržišču možno dobiti raznorazne pripravke, ki izboljšujejo rast in razvoj sadnih vrst (gnojila, mikrohranila, aminokisline, itd.). Čedalje več je v ponudbi raznih mikrobioloških pripravkov, kot so razni inokulumi, vendar se zaradi visokih cen to v praksi težko obnese uporaba le teh, sploh v večjih pridelovalnih nasadih. Moser (1958, cit. po Koron, 2008) je v Avstriji uporabil prve inokulume ektomikoriznih gliv in sicer glivo češka gomoljika (*Pisolithus tinctorius*), v drevesnicah. Kasneje je Castellano (1994, cit. po Koron, 2008) poročal o uporabi inokuluma v gozdnih drevesnicah. Za vzpostavitev ektomikorize so uporabljali rizosferna tla, inokulirane ratline, spore (). Zahtevnejše in dolgotrajnejše je pridobivanje inokuluma arbuskularne mikorize, ker lahko arbuskularne glive vzdržujemo oz. gojimo le skupaj z gostiteljskimi rastlinami. te pa moramo ustrezno zaščititi pred patogenimi glivami. Cene teh inokulumov so zelo visoke in se težko uveljavijo na tržišču (Koron, 2008).

Inokulum iz ErM gliv so uporabljali na Novi Zelandiji, kjer v nasadih ameriške borovnice ni naravno prisotnega inokuluma in so ga zato dodajali sadikam ob presajanju. Je pa sama uporaba omejena zaradi pomanjkanja komercialnih izdelkov inokuluma (Koron, 2008).

Vega in sod. (2009) so delali poskus v rastlinjaku in spremljali dodatek komercialnega inokuluma *Hymenosyphus ericae* (MYCOSYM TRITON), inokuluma arbuskularne mikorize in inokuluma iz nasada ameriške borovnice sorte O'Neal, ter kontrolo brez inokuluma. Imeli so sadike iz potaknjencev in iz tkivnih kultur. Pri dolžini poganjkov ni bilo razlik med obravnavanji, medtem ko so bile med obravnavanji razlike pri širini poganjkov in sicer so bili poganjki ožji pri in vitro sadikah okuženih z inokulumom iz nasada kot pri komercialnem. Pri potaknjencih razlik ni bilo, verjetno zaradi presajanja in posledično poškodb na koreninah. Suha teža korenin je bila pri in vitro potaknjencih in z komercialnim inokulumom večja kot pri potaknjencih z obema naravnim inokulumom in

kontrolno. Inokulum arbuskularne mikorize se je izkazal kot najslabše učinkovit. Na koncu so dognali, da imajo mikorizne glive različne biotipe, ki so značilni za določeno območje, kjer so bili vzorčeni in se zato različno odzivajo na novem območju. Zato bi bilo priporočljivo namnoževati seve, ki so bolj učinkoviti kot simbionti za ameriško borovnico, ki so prisotni na rastišču samem. Ugotovili so tudi, da bi bilo potrebno za boljše spremljanje mikorize poskus narediti v samem nasadu in ne z lončnim poskusom.

V študiji Bizabani in Dames (2015b) so iz vrese *Erica cerinthoides* L. in *Erica demmissa* Klotzsch ex Bent izolirali glive iz roda *Lachnum* in *Cadophora*. Obe naj bi bile ErM glivi. Okužili so korenine mikropropagiranih sadik ameriške borovnice sort 'Bluecrop', 'Elliott', 'Spartan', 'Chandler' in 'Brightwell'. Samo pri sorti 'Brightwell' in 'Elliott' so ugotovili boljšo rast poganjkov, pri ostalih ni bilo razlik. Dognali so, da ima pri teh dveh sortah ta inokulum potencial za uporabo.

Večinoma se inokulum uporablja v znanstvene namene, v laboratorijskih poskusih ali v rastlinjakih, vsaj kar se tiče najdenih objav. Zelo malo je znanega o uporabi inokuluma v komercialne namene, nekaj primerov zgoraj. Erikoidna mikoriza ni tako razširjena in uporabna kot npr. arbuskularna in tudi študij je narejenih bolj malo, vsaj novejših.

3 MATERIALI IN METODE

Raziskave smo izvedli v dveh sklopih (1) poskus v trajnih nasadih ameriške borovnice na Ljubljanskem barju in (2) lončni poskus.

1. Za potrebe raziskav sestave združb mikoriznih gliv v nasadih ameriške borovnice v sklopu magistrske naloge, smo izbrali lokacijo na enem izmed trajnih nasadov ameriške borovnice na Ljubljanskem barju, v bližini naselja Bistra, kjer se že od leta 1984 ukvarjajo s pridelavo ameriške borovnice. Na lokaciji smo med letom 2013 (oktobra) in 2014 (aprila in junija) vzorčili korenine grmov ameriške borovnice dveh različnih starosti (lokacija 1 – 30 let star nasad, lokacija 2 – 18 let star nasad; slika 2). Spomladi in poleti 2014 smo s PVC folijo zaščitili 3 grme in tla okoli izbranih grmov na obeh lokacijah, zaradi škropljenja oz. uporabe fitofarmacevtskih sredstev (FFS), ki so služili kot kontrole brez škropljenja.

2. Drug del raziskav je bil lončni poskus s tremi različnimi sortami ameriške borovnice, izveden med letoma 2013 in 2014 (datumi vzorčenj so navedeni v Preglednici 1), v katerem smo spremljali vpliv inokulacije sadik ameriške borovnice z dvema tipoma inokuluma, in sicer komercialni inokulum z erikoidnimi mikoriznimi glivami, Rhodovit® (Symbiom, Republika Češka) in naravni inokulum, t.j. rizosferna tla in korenine rastlin gozdne borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.). Slednje smo tik pred začetkom poskusa vzorčili v bližnjem gozdu v Jelah pri Borovnici (slika 3). Spremljali smo tudi vpliv škropljenja s fungicidi Score 250 EC, Switch 62,5 WG in Signum na rast in razvoj sadik.

3.1 POSKUS V TRAJNIH NASADIH AMERIŠKE BOROVNICE NA LJUBLJANSKEM BARJU

3.1.1 Opis nasadov

Nasadi ameriške borovnice, kjer smo vzorčili, se nahajajo v bližini naselja Bistra, na področju Natura 2000, v Krajinskem parku Ljubljansko barje. Vzorčili smo na dveh lokacijah, ki imata primerljivo sestavo in obdelavo tal, sestavo rastlinskih združb v medvrstnih prostorih, način sajenja in sorto rastlin. Lokaciji se razlikujeta po starosti, in sicer (1) najstarejši nasad na tem območju z domačim imenom »Stari nasad«, kjer so grmi borovnic stari 30 let in (2) mlajši nasad »Za barako«, ki ima 18 let. Analizirali smo tudi korenine petih sadik borovnic, kupljenih v italijanski drevesnici ViVai Pianta Battistini. Za vzorčenje smo izbrali sorto 'Bluecrop' (opis v nadaljevanju v poglavju Uporabljene sorte ameriške borovnice).

Medvrstna razdalja med grmi je od 2,5 m do 3 m, medtem ko je razdalja med grmi v vrsti 1,5 m. V obeh nasadih se mulči medvrstni prostor, medtem ko se zapleveljenost v vrstah, med grmi, kosi z ročno kosilnico ali pa z uporabo herbicidov. Gnoji se z dušikovimi mineralnimi gnojili, ki so posebej primerni za ameriško borovnico, ker vsebujejo tudi amonijsko obliko dušika (N-GOOO (Adriatica Spa, Italija), ki ima 16,5 % amonijske, 9,5 % amidne oblike N in 44 % žvepla (SO_3), ter inhibitor DCD za počasno sproščanje), PK mineralnimi gnojili (14 % fosforja in 28 % kalija in foliarnimi gnojili, ki vsebujejo tudi mikrohranila. Z dušikovimi gnojili gnojimo pred in po cvetenju, s foliarnimi gnojili po cvetenju, da se ne uniči cvetov in s PK gnojili po končani sezoni (jeseni) Vsa gnojenja opravljamo na podlagi analize tal in svetovanja s strani strokovnjakov s Kmetijskega inštituta Slovenije (glej priloge). Zaradi lokalnih klimatskih razmer so nasadi zavarovani z mrežnimi sistemi za zaščito proti toči in pticam.

Zaradi obdelave tal oz. mulčenja medvrstnega prostora, košnje z ročno koso in gnojenja z mineralnimi gnojili smo v nasadu s pomočjo knjige Mala flora Slovenije, popisali predvsem trave, kot so angleška ljulka (*Lolium perenne* L.), navadna pasja trava (*Dactylis glomerata* L.), plazeča pirnica (*Agropiron repens* L.), modra stožka (*Molinia caerulea* (L.) Moench) in rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) P. Beauv). Najbolj pogoste močvirske rastline, ki se razraščajo predvsem ob vodnih jarkih so navadni loček (*Juncus effusus* L.), žabji loček (*Juncus bufonius* L.), širokolisni rogoz (*Typha latifolia* L.), trpotčasi porečnik (*Alisma plantago aquatica* L.) Od metuljnic je najbolj razširjena plazeča detelja (*Trifolium repens* L.). Od zeli se pojavljajo predvsem navadni regrat (*Taraxacum officinale* Web. et Wig.), navadni plotni slak (*Calystegia sepium* L.), velika kopriva (*Urtica dioica* L.), navadna loboda (*Atriplex patula* L.), bela metlika (*Chenopodium album* L.) Na okoliških lokacijah so površine v zaraščanju, kjer prevladuje kanadska zlata rozga (*Solidago canadensis* L.), krhlika (*Frangula alnus* Mill.), črna jelša (*Alnus glutinosa* L.), navadna breza (*Betula pendula* Roth.) in vrba (*Salix cinerea* L.).



Slika 2: Lokaciji vzorčenja korenin grmov ameriške borovnice sorte 'Bluecrop', v dveh nasadih različne starosti na Ljubljanskem barju. Lokacija 1 je nasad, ki je star 30 let, lokacija 2 je nasad star 18 let (Google Maps, 2015).

Figure 2: Location of sampling of the blueberry bushes roots of 'Bluecrop' cultivar in two plantations of different age on the Ljubljana Marsh. Location 1 is the plantation, which is 30 years old, the location 2 is the plantation, which is 18 years old (Google Maps, 2015).

Uporabljene sorte ameriške borovnice

Pri poskusu v nasadu, smo vzorčili sorto 'Bluecrop', saj je nasajena na obeh lokacijah. Sorta 'Bluecrop' ima bujno, visoko in široko rast. Listje je drobno do srednje veliko. Zori od konca julija do sredine avgusta. Sorta bujno zori in ima obilne grozde. Jagode so debele z obilnim poprhom, sladko kiselkastega okusa in aromatične. Dobro prenaša nizke temperature in sušo.

Zaščita pred boleznimi

V nasadu je uporaba fungicidov dolgoletna praksa, saj zmanjša izpade pridelka. Oba nasada ameriške borovnice oz. lokaciji vzorčenja (lokacija 1, starosti 30 let in lokacija 2, starosti 18 let), sta bila v času rasti in razvoja brstov škropljena s pripravki Score 250 EC, Switch 62,5 WG in Signum. Tretiranje se je začelo s pripravkom Score 250 EC in sicer prvič 18. 4. 2014 in drugič 4. 5. 2014 v kombinaciji s pripravkom Switch 62,5 WG. Tretje tretiranje je bilo opravljeno 15. 5. 2014, in sicer s pripravkoma Switch 62,5 WG in Sygnum. Grme ameriške borovnice, ki so predstavljali kontrolo, t.j. brez škropljenja in tla okoli kontrolnih grmov smo v času škropljenja oz. tretiranja zaščitili z zaščitno PVC folijo, da škropivo ne bi prišlo v stik z rastlino in tlemi.

Fitofarmacevtska sredstva (FFS) oz. fungicide smo uporabili za zaščito pred boleznimi, ki prizadenejo ameriško borovnico, in sicer brstno monilijo ameriške borovnice (*Monilinia vaccinii-corymbosi*), sivo plesnijo (*Botrytis cinerea*) in antraknozo (*Colletotrichum acutatum*).

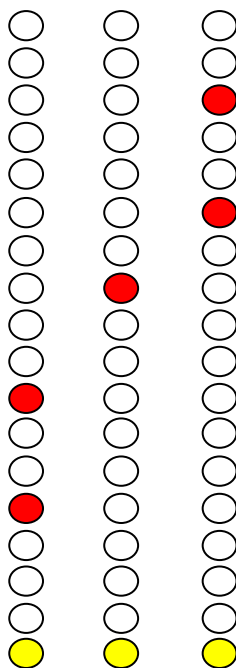
- Brstna monilija ameriške borovnice ima dve stopnji okužbe: primarna okužba z apoteciji v tleh najprej okuži listne brste, ki so se začeli odpirati. Na njih se tvorijo konidiji, ki nato okužijo cvetove (sekundarna okužba). Iz okuženih cvetov se tvorijo plodovi, ki se kasneje pretvorijo v belkaste mumije, na katerih se spomladi tvorijo apoteciji, ki zopet okužijo mlade poganjke in brste.
- Siva plesen je splošno znana sadna bolezen in se pojavi kot sivkast puh že na cvetovih in kasneje na plodovih, ponavadi ob bolj vlažnih letih z veliko padavin in z visokimi temperaturami.
- Antraknoza sodi med najpomembnejše glivične bolezni gojenih borovnic, ki prizadane predvsem plodove. Ti se v času zorenja in med skladiščenjem značilno zgubajo in zmehčajo, prekrijejo jih oranžne sluzaste gmote trosov, ki širijo bolezen na zdrave plodove. Bolj izrazita je v bolj vlažnih letih z obilico padavin in dolgotrajno jutranjo meglo.

Spodaj je predstavljen kratek opis FFS, ki smo jih uporabili za zaščito pred boleznimi in ki so dovoljena za uporabo pri ameriški borovnici v integrirani pridelavi.

- Score 250 EC je sistemični fungicid, ki deluje tako preventivno kot kurativno tako, da prepreči tudi nadaljnje širjenje bolezni. Aktivna snov difenokonazol spada v skupino triazolov. Aktivna snov difenokonazol se prek zelenih delov rastline (listov in stebela) hitro vsrka v rastlino, tako da jo dež po tem ne more več izprati. Kurativni učinek sredstva je največ 96 ur pri povprečni temperaturi 10 °C, pri višjih temperaturah pa je seveda ta čas krajši. Preventivno delovanje fungicida traja največ 3 dni, zato mu je treba dodajati kontaktni fungicid.
- Switch 62,5 WG je kombinirani fungicid iz dveh aktivnih snovi, ki delujeta tako sistemsko kot tudi kontaktno. Aktivni snovi ciprodinil in fludioksinil spadata v različni skupini fungicidov in med njima ni možne navzkrižne rezistence. Sredstvo deluje na vse poglavitne faze razvoja gliv. Preprečuje površinsko rast glive, vdor in rast micelija v rastlini, prav tako zavira sporulacijo.
- Signum[®] je preventivni sistemični fungicid iz dveh aktivnih snovi boskalida in piraklostrobina.

3.1.2 Vzorčenje v nasadu

Na spodnji shemi je prikazano, kako smo izvedli zasnovno poskusa za vzorčenje in tretiranje s FFS. Na njivi s tremi sadilnimi vrstami ameriške borovnice sorte 'Bluecrop', smo za vzorčenje izbrali 5 grmov (obarvano z rdečo). Teh pet grmov je bilo tretiranih s FFS, tako kot celotni nasad. Grmi, ki so obarvani z rumeno so bili kontrolni grmi, ki smo jih skupaj s tlemi okrog grma zaščitili s folijo. Ta shema velja (se ponovi) za obe lokaciji vzorčenja (nasad 30 let in nasad 18 let). Zaradi obsežnih okužb z brstno monilijo ameriške borovnice v nasadih, smo morali vzorčenje prilagoditi. Zato smo vzeli samo tri kontrolne grme na začetku vrst, ker je bilo tako lažje za izvajanje zaščite s FFS. Tudi število vzorčnih grmov, smo zaradi čim manjšega poseganja v pridelovalne sposobnosti nasada, zmanjšali in jih vzeli samo 5. Vzorčili smo diagonalno po celotni njivi, da smo zajeli večjo raznolikost.



Slika 3: Slika prikazuje zasnovo vzorčenja korenin pri ameriški borovnici sorte 'Bluecrop' v obeh nasadih starosti 30 (lokacija 1) in 18 let (lokacija 2). Z rdečo barvo so označeni vzorčeni grmi, ki so bili normalno tretirani s FFS. Z rumeno so označeni vzorčeni grmi, ki so bili skupaj s tlemi okoli njih zaščiteni s folijo in predstavljajo kontrolne grme.

Figure 3: Sampling scheme for highbush blueberry roots of 'Bluecrop' cultivar in both plantations – 30-year (location 1) and 18-year (location 2). The sampled blueberry shrubs, marked with red color, were normally treated with pesticides. The shrubs and the soil around the yellow color marked sampled shrubs represent the control shrubs and were not treated with the pesticides.

Na obeh lokacijah smo izbrali po osem grmov ameriške borovnice, od katerih so bili trije grmi na vsaki lokaciji kontrole brez škropljenja (Slika 3). Za vzorčenje korenin smo najprej uporabljali talno sondo, vendar smo ugotovili, da s sondo ne odvezamemo dovolj drobnih korenin. Nato smo poskusili s sadilno lopato, kjer smo imeli večji izplen korenin.

Vzorčili smo do globine ~20 cm in v radiju enega metra okrog grma, ker je bilo tam največ korenin. Tla so bila ob vzorčenju tudi dobro namočena, tako da so se korenine in tla držali v grudi.

Vzorčili smo v treh rastnih obdobjih.

- Prvo vzorčenje smo opravili oktobra 2013 oz. po koncu rastne sezone, ko so rastline prehajale v fazo mirovanja.
- Drugo vzorčenje smo ponovili aprila 2014, ko so rastline začele prehajati v fazo rasti in razvoja brstov. V tem času smo začeli tudi s prvim tretiranjem rastlin s fitofarmacevtskimi sredstvi (FFS).
- Tretje vzorčenje je bilo izvedeno junija (ca 30 dni po zadnji uporabi FFS), ko se je začela tvorba plodov oz. pred zorenjem in obiranjem plodov v letu 2014.

Preglednica 1: Načrt vzorčenja po številu odvzetih vzorcev na obeh lokacijah v letih 2013 in 2014. Vzorčene so bile korenine pri grmih ameriške borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.) sorte 'Bluecrop', ki so bili normalno tretirani s FFS in pa kontrolni grmi, ki so bili zaščiteni s folijo. Tretiranje je potekalo spomladi in poleti 2014. Kontrolne sadike so bile kupljene v Italiji.

Table 1: Sampling plan by the number of samples collected at both sites in 2013 and 2014. We sampled the roots of the blueberries bushes (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties 'Bluecrop', which were normally treated with pesticides and a control bushes, which have been protected by a plastic film. Treatment was conducted in the spring and summer of 2014. Control seedlings, which were purchased in Italy.

Čas vzorčenja	Kupljene sadike	Starost nasada (lokacija 2) 18 let	Starost nasada (lokacija 1) 30 let
oktober 2013	5 sadike	5 grmov (s FFS)	5 grmov (s FFS)
april 2014	/	5 grmov (s FFS) 3 kontrole (brez FFS)	5 grmov (s FFS) 3 kontrole (brez FFS)
junij 2014	/	5 grmov (s FFS) 3 kontrole (brez FFS)	5 grmov (s FFS) 3 kontrole (brez FFS)

V preglednici 2 so navedene slike lokacij vzorčenja in kontrole, sorte 'Bluecrop'. Prva, druga in tretja slika prikazuje jesensko vzorčenje 2013, in sicer kupljeno sadiko, lokacijo 1 in lokacijo 2. Na četrti in peti sliki sta prikazani lokacija 1 in lokacija 2 v času spomladanskega vzorčenja 2014 ter na šesti in sedmi sliki lokacija 1 in lokacija 2 v času poletnega vzorčenja 2014.

Preglednica 2: Fotografije grmov in lokacij vzorčenja v času vzorčenja.
Table 2: Photos of bushes and sampling locations during the sampling period.

Št. slike	Fotografija	Opis
1.		Kupljena sadika ameriške borovnice sorte 'Bluecrop', november 2013.
2.		Jesensko vzorčenje 2013 na lokaciji 1, nasad sorte 'Bluecrop', starosti 30 let.
3.		Jesensko vzorčenje 2013, na lokaciji 2, nasad sorte 'Bluecrop', starosti 18 let.
4.		Spomladansko vzorčenje 2014, na lokaciji 1, nasad sorte 'Bluecrop', starosti 30 let.
5.		Spomladansko vzorčenje 2014, na lokaciji 2, nasad sorte 'Bluecrop', starosti 18 let.

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Fotografije sadik in lokacij vzorčenja v času vzorčenja.

Št. slike	Fotografija	Opis
6.		Poletno vzorčenje 2014, na lokaciji 1, nasad sorte 'Bluecrop', starosti 30 let.
7.		Poletno vzorčenje 2014, na lokaciji 2, nasad sorte 'Bluecrop', starosti 18 let.

3.1.3 Priprava vzorcev po vzorčenju

Priprava vzorcev korenin ameriške borovnice je potekala po dveh postopkih. Najprej smo jih očistili, nato pa še zmleli.

Vse vzorce smo ločili na substrat (tla) in korenine. Vzorce korenin smo sprali najprej pod tekočo vodo, nato pa jih del posušili pri sobni temperaturi, del pa shranili v 70 % etanol za nadaljnje analize.

Za molekularne analize smo v laboratoriju vzorce posušenih korenin vsakega posebej homogenizirali z mletjem v mešalnem mlinu (Retsch, Nemčija) pri frekvenci 25 s^{-1} za 60 s. Po potrebi smo čas mletja podaljšali. Pred in po mletju vsakega vzorca smo delovno površino očistili s 70 % raztopino etanola. Jeklene čaše in uporabljen pribor smo najprej očistili z 10 % raztopino arekine, ki vsebuje 67 g/l Na-hipoklorita, jih potem splaknili pod tekočo vodo in nato očistili še z 70 % raztopino etanola. Pred vsako uporabo smo jeklene čaše osušili. Zmlete vzorec smo shranili v mikrocentrifugirke.

3.1.4 Molekulske analize erikoidnih mikoriznih združb v nasadih ameriške borovnice na ljubljanskem barju

3.1.4.1 Izolacija DNK

DNK smo izolirali iz 0,05 g homogeniziranih korenin z uporabo izolacijskega kita PowerPlant DNA (MoBio Solano Beach, CA, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca. Izolirano DNK vseh 47 vzorcev, smo do nadaljnjih analiz hranili pri temperaturi -20 °C.

Za samo izolacijo DNK smo v mikrocentrifugirke s kovinskimi kroglicami zatehtali 50 mg vzorca zmletih korenin in nato dodali 550 µl raztopine (Bead Solution), ki vsebuje pufer. Ta navlaži tkivo in ščiti nukleinske kisline pred razpadom. Vsebino mikrocentrifugirke smo zmešali na stresalniku. Nato smo dodali 60 µl raztopine PB1, ki vsebuje anionske detergente, ki razbijejo proteine, maščobne kisline in lipide, prisotne v celičnih membranah. Z inkubacijo v vodni kopeli pri 60 °C smo izboljšali homogenizacijo vzorčnega tkiva. Po vodni kopeli smo mikrocentrifugirke z vzorci predstavili na stresalnik, da smo s kovinskimi kroglicami še fizično razbili celice. Mikrocentrifugirke smo nato predstavili v centrifugo za 1 min. pri 10.000 obratih min⁻¹, da smo trdne delce ločili od tekočine. Tekočino smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in dodali 250 µl raztopine PB2, ki obori snovi, ki ne vsebujejo DNK in ostanke tkiva in jih inkubirali pri 4 °C 5 min., da se snovi bolje oborijo. Nato smo centrifugirali 2 min. pri 10.000 obratih min⁻¹, da je oborina sedla na dno. Supernatant (tekočino) smo prenesli v nove mikrocentrifugirke. Pri tem koraku smo dodali 1 ml raztopine PB3, ki vsebuje 99 % izopropanola, ki očisti DNK organskih nečistoč, dobro premešali in inkubirali pri sobni temperaturi 10 min., da je bil učinek boljši. Po inkubaciji smo vzorce 15 min. centrifugirali pri 13.000 obratih min⁻¹, da se je zaradi izopropanola DNK oborila na dno mikrocentrifugirk. Ko smo odlili supernatant, ki vsebuje organske ostanke, smo dodali 100 µl raztopine PB6, da se DNK ponovno raztopi in 500 µl raztopine PB4, ki vsebuje visoko koncentracijo soli, ki veže DNK na membrano, da se ta ne spere, ko centrifugiramo za 1 min. pri 10.000 obratih min⁻¹. Skozi filter se izločijo samo nečistoče, ki so bile še prisotne. Po centrifugiranju smo odlili tekočino, ki je šla skozi filter in tega ponovno dali v mikrocentrifugirko. Dodali smo 500 µl raztopine PB5, ki vsebuje etanol. Ta očisti na filter vezano DNK soli in ostalih nečistoč, medtem ko DNK ostane na filtru. Centrifugirali smo 30 sekund pri 10.000 obratih min⁻¹, da smo s filtra odstranili ves ostanek, ki ne vsebuje DNK. Tekočino, ki je šla skozi filter, smo odlili in ponovno centrifugirali 2 min. pri 11.000 obratih min⁻¹, da smo odstranili še ostanke etanola, ki lahko vplivajo na nadaljnje postopke analiz DNK. Po centrifugiranju smo odstranili filter, ki vsebuje DNK in ga predstavili v nove mikrocentrifugirke. Dodali smo 50 µl raztopine PB6 direktno v sredino filtra, da smo celotno membrano filtra namočili in s filtra s centrifugiranjem odstranili celotno vezano DNK. Filter smo po centrifugiranju odstranili,

tekočina, ki je šla skozi vsebuje vso DNK, ki je pripravljena za nadaljnje analize. Vzorce DNK smo nato shranili pri temperaturi -20°C .

Ker so bili nekateri vzorci DNK še obarvani, kar pomeni, da so vsebovali nečistoče, ki lahko inhibirajo verižno reakcijo s polimerazo (PCR), smo uporabili še protokol čiščenja DNK (PowerPlant DNA – Clean Up Protocol, MoBio Solano Beach, CA, ZDA). Najprej smo vzorce razredčili s sterilizirano vodo do $150\ \mu\text{l}$ in dodali še $20\ \mu\text{l}$ raztopine Bead Solution, ki varuje DNK pred razpadom tekom protokola. Vse skupaj smo dobro premešali. Nato smo dodali $85\ \mu\text{l}$ raztopine PB2, ki obori snovi, ki ne vsebujejo DNK. Vse smo zopet premešali in inkubirali v hladilniku pri 4°C 5 min. Nato smo vse skupaj 2 min. centrifugirali pri $10.000\ \text{obratih min}^{-1}$. Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v nove mikrocentrifugirke in dodali $70\ \mu\text{l}$ raztopine PB7, ki pri inkubaciji pri 4°C obori nečistoče v vzorcu. Da se oborina usede na dno, smo vzorce centrifugirali pri $10.000\ \text{obratih min}^{-1}$ 2 min. Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v nove mikrocentrifugirke in dodali $0,5\ \text{ml}$ raztopine PB3, ki vsebuje izopropanol, ki obori DNK. Vzorce smo centrifugirali pri $13.000\ \text{obratih min}^{-1}$ 15 min. Po centrifugiranju smo odlili tekočino in pustili vzorce, da izhlapi ves izopropanol. Na koncu smo dodali $30\ \mu\text{l}$ raztopine PB6, ki konzervira in ščiti DNK pred razpadom. Vzorce smo po končanem postopku zamrznili pri -20°C .

3.1.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnoževali 850 baznih parov dolg fragment DNK iz izolata oz. ekstrakta celokupne DNK, izolirane iz homogeniziranih korenin, s parom začetnih oligonukleotidov ITS1F (specifični začetni oligonukleotid za askomicete, bazidiomicete in zigomicete; Gardens in Bruns, 1993) in ITS4R (specifični oligonukleotid za askomicete, bazidiomicete in zigomicete; White in sod., 1990).

- PCR protokol 1

PCR smo izvedli v $25\ \mu\text{l}$ reakcijski mešanici, kamor smo dodali $1\ \mu\text{l}$ izolirane DNK, $15,7\ \mu\text{l}$ sterilne destilirane vode, $0,75\ \mu\text{l}$ $50\ \text{mM}$ MgCl_2 (InvitrogenTM), $2,5\ \mu\text{l}$ $10\times$ PCR pufra z MgCl_2 (InvitrogenTM), $2\ \mu\text{l}$ $10\ \text{mM}$ dNTPs (Invitrogen; $10\ \text{pM}$ vsakega izmed začetnih oligonukleotidov) in na koncu $1,125\ \mu\text{l}$ $5\ \text{U}$ polimeraze Taq (InvitrogenTM). Pogoji pomnoževanja v aparatu Applied Biosystems[®] 2720 Thermal Cycler so bili: začetna denaturacija na 94°C za 3 min.; 35 ciklov z denaturacijo pri 94°C , 45 s, prileganjem pri 55°C , 30 s in podaljševanjem pri 72°C , 90 s; končno podaljševanje pri potekalo pri 72°C , 10 min.

- PCR protokol 2

PCR za DNK, izolirano iz kolonij *E. coli* po kloniranju (poglavje 3.1.3.5.), smo izvedli v 11 µl reakcijski mešanici, kamor smo dodali 1 µl izolirane DNK, 7 µl sterilne destilirane vode, 0,6 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10x PCR pufra z dodanim MgCl₂, 0,8 µl 10 mM dNTPs, 0,2 µl vsakega izmed začetnih oligonukleotidov T7 in SP6 in na koncu 0,2 µl 5 U polimeraze Taq (InvitrogenTM). Pogoji pomnoževanja v aparatu Applied Biosystems[®] 2720 Thermal Cycler so bili: začetna denaturacija na 95 °C za 2 min.; 30 ciklov z denaturacijo pri 92 °C, 30 s, prileganjem pri 50 °C, 30 s in podaljševanjem pri 72 °C, 60 s; končno podaljševanje je potekalo pri 72 °C, 10 min.

- Čiščenje produktov PCR

Produkte PCR smo očistili po metodi proizvajalca za QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Ltd. Crawley, VB). V vzorec smo dodali 5x količino pufra PB, ki vsebuje soli, ki vežejo DNK na membrano, da se ta ne spere. Nato smo preko priloženega filtra s 60 s centrifugiranjem prefiltrirali vzorec. Po centrifugiranju smo odlili ostanek tekočine (nečistoče), saj se je DNK vezala na filter. Nato smo dodali še 0,75 ml raztopine PE (vsebuje etanol), ki prav tako s 60 s centrifugiranjem izloči nečistoče, DNK pa ostane vezana v filtru. Po odlitju odpadne tekočine smo še enkrat centrifugirali 60 s, da smo izločili ves etanol. Filter smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in s 30 µl raztopine EB (10 mM Tris-CL), sprali DNK iz filtra v mikrocentrifugirko. Raztopina EB služi za zaščito DNK pred razpadom pri shranjevanju. Po končanem postopku smo preverili dolžino očiščenih produktov PCR s postopkom elektroforeze.

3.1.4.3 Agarozna elektroforeza

Pri elektroforezi smo uporabljali 1 % agarozni gel. Zatehtali smo 1 g agaroze in dodali 100 ml 0,5X pufra TBE. Erlenmajerico s pufrom in agarozo smo dali v mikrovalovno pečico in jo segrevali toliko časa, da se je agarozna raztopila. Nato smo počakali, da se je vsebina ohladila. Dodali smo 1 µl barvila SYBR Safe DNK (InvitrogenTM) in premešali. Gel smo razlili v nosilec za gel s primernim glavnikom in počakali, da je polimeriziral. Gel smo postavili v elektroforetsko banjico in ga prelili z 0,5X pufrom TBE. Na parafilm smo nanесли kapljico barvila (2 µl 6x Loading dye, Thermo ScientificTM) in jo pomešali z 3 µl vzorca DNK. Mešanico vzorca in barvila smo vnesli v jamico agaroznega gela. V prvo in zadnjo jamico smo vnesli velikostno lestvico (100 bp DNA Ladder, InvitrogenTM). Elektroforetsko banjico smo priključili na električno polje ustrezne jakosti. Po končani elektroforezi smo gel prenesli na Safe Imager Blue Light transiluminator (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA 92008 USA) in ga fotografirali.

3.1.4.4 Čiščenje produktov PCR iz gela

Produkte PCR smo očistili iz gela po metodi proizvajalca za QIAquick Gel Purification Kit (Qiagen Ltd. Crawley, VB). Vzorce, ki so imeli fragment dolžine 850 baznih parov (bp) smo očistili gela tako, da smo ga izrezali in dodali v vsako mikrocentrifugirko z izrezanim gelom 500 μ l QG pufra, ki raztopi gel. Mešanico smo 10 min. segrevali na 50 °C in vsake toliko časa še pomešali, da se je gel v celoti raztopil. Mešanico z raztopljenim gelom smo predstavili v mikrocentrifugirke z filtrom, da smo s centrifugo pri 13.000 obratih min^{-1} filtrirali tekočino. Tekočino smo odlili in dodali na filter 0,5 ml pufra QG in spet centrifugirali 1 min. S tem korakom smo izločili ves gel iz filtra. Ko smo odlili tekoči del, smo dodali 0,75 ml PE pufra (vsebuje etanol) in pustili delovati cca. 5 min., da izločimo nečistoče, potem smo spet centrifugirali 1 min. Odlili smo tekočino in filtre predstavili v nove mikrocentrifugirke in dodali 30 μ l pufra EB, ki odstrani DNK iz filtra in ga ščiti pred razpadom, med zamrzovanjem. Po centrifugiranju smo filter odstranili, na dnu mikrocentrifugirke pa je ostal naš vzorec DNK, ki smo nato shranili v zamrzovalnik pri -20 °C.

3.1.4.5 Priprava knjižnic genov ITS rRNK

Uspešno namnožene produkte PCR, smo vstavili v vektor pGEM-T Easy Vector (Promega Co., Madison, ZDA) in klonirali v celice bakterije *Escherichia coli* (JM109 High Efficiency Competent *Escherichia coli*) (Promega Co., Madison, ZDA). Pozitivno transformirane celice smo identificirali z uporabo standardnega namnoževanja z uporabo para začetnih nukleotidov SP6-T7. Klone z ustrežno dolžino fragmenta, smo izbrali za sekvenciranje po Sangerju, ki ga je izvedlo podjetje Macrogen Inc. (Nizozemska).

Priprava reagentov za postopek kloniranja:

- Ampicilin (Amp): 1 g Ampicillin Sodium (Duchefa) na 10 ml destilirane vode, sterilizacija s filtracijo
- IPTG: 0,238 g IPTG (Fermentans) v 10 ml destilirane vode, sterilizacija s filtracijo
- X-gal: 0,2 g 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich) v 4 ml n,n-dimetilformamida
- Medij SOC: 2 g Bacto-Tryptona (Duchefa), 0,5 g ekstrakta Bacto-Yeast (Duchefa), 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, 1 ml 2 M Mg^{2+} in 1 ml 2 M glukoze

Priprava medijev:

1. Gojišče za rast belo modrih kolonij

LB + Amp + X-gal + IPTG (250 ml): 7,5 g LB agarja (low salt, Duchefa) smo zmešali z destilirano vodo do 250 ml, nato smo dali za 20 min. v avtoklav, ko se je ohladil na 50 °C, smo dodali v laminariju 250 µl Amp, 1250 µl IPTG in 400 µl X-gal, ki smo jih predhodno sterilizirali s filtracijo.. Ko so se plošče strdile, smo jih shranili v hladilnik.

2. Gojišče za rast izbranih belih kolonij

LB + Amp (250 ml): 7,5 g agarja LB (low salt, Duchefa) smo zmešali z destilirano vodo do 250 ml, nato smo medij 20 min. avtoklavirali. Ko se je medij ohladil na 50 °C, smo dodali v laminariju še 250 µl Amp in nato medij razlili na gojitvene plošče. Ko so se plošče strdile, smo jih shranili v hladilnik.

3. Tekoče gojišče LB (Luria Bertanijevo gojišče)

10 g Bacto-Trypton, 5 g ekstrakt Bacto-Yeast, 5 g NaCl v 1 l destilirane vode. Medij smo dali za 20 min. avtoklavirali in nato shranili v hladilniku pri 4 °C.

Priprava mikrotiterskih plošč:

1. Plošče za shranjevanje klonov (tekoči medij)

Predhodno narejenemu tekočemu gojišču LB smo v laminariju dodali še 100 µl ampicilina na 100 ml medija in plošče zaščitili s parafilmom ter jih spravili v hladilnik.

2. Plošče za pošiljanje na sekvenciranje na MacroGen (trdni medij)

LB + Amp: 7,5 g LB agarja (low salt) do 250 ml destilirane vode, nato smo 20 min. avtoklavirali, ko se je ohladil na 50 °C, smo v laminariju dodali še 250 µl Amp. V vsako odprtino mikrotiterske plošče smo nato z multikanalno pipeto dodali 150 µl medija. Ko so se plošče strdile smo jih zaščitili s parafilmom in shranili v hladilniku pri 4 °C.

Ligacija

Uporabili smo protokol pGEM®-T Easy Vector System (Promega). Po navodilih proizvajalca smo zmešali ligacijsko mešanico iz 0,5 µl 2x ligacijskega pufra, 3,5 µl produkta PCR, ki smo ju zmešali na stresalniku in nato dodali še 0,5 µl vektorja Easy in 1 µl T4 ligaze. Vse smo delali ob plamenu gorilnika in nato 24 ur inkubirali pri 4 °C.

Transformacija

Najprej smo na ledu ohladili 2 µl ligacijske mešanice in odtalili kompetentne celice *E. coli* (JM109 High Efficiency Competent Cells, Promega).. Za vsak vzorec ligacijske mešanice smo razdelili po cca. 30 µl celic in vanje dodali ligacijsko mešanico. 20 min. smo inkubirali na ledu, potem smo jih 45 s inkubirali pri 42 °C in potem nazaj na ledu za

2 min. Ligacijski mešanici s celicami smo dodali 600 µl medija SOC, ohlajenega na ledu. Vse skupaj smo inkubirali pri 37 °C 2 uri. Iz hladilnika smo vzeli plošče z Amp, X-gal in IPTG, da so se aklimatizirale na sobno temperaturo. Po inkubiranju smo celice nanесли na gojišče in jih inkubirali 24 ur pri 37 °C.

Pregled gojišč

Po 24-urni inkubaciji smo vzorce vzeli iz inkubatorja in jih predstavili v hladilnik, da smo dobili bolj izrazito barvo modrih kolonij. Potem smo v laminariju iz plošč precepili bele kolonije v mikrotiterseke plošče s tekočim gojiščem in jih dali nazaj v inkubator na 37 °C za 24 ur. Naslednji dan smo 10 µl prenesli na mikrotiterske plošče s trdim gojiščem. Ploščam s tekočim gojiščem smo dodali 50 % avtoklaviranega glicerola in jih shranili pri – 20 °C.

3.1.4.6 Sekvenciranje

Za sekvenciranje smo najprej v mikrotiterske plošče s tekočim gojiščem (opis v poglavju 3.2.6.) nacepili bele kolonije, ki so zrastle na petrijevkah. Označili smo jih glede na oznako vzorca. Plošče smo čez noč inkubirali na 37 °C. Iz tekočih plošč, smo na trdne mikrotiterske plošče (opis v poglavju 3.2.6.) precepili tiste kolonije, ki so zrastle. Skupno smo iz vseh vzorcev pridobili 211 klonov, ki smo jih poslali na sekvenciranje v laboratorij Macrogen (Nizozemska).

3.1.5 Kolonizacija korenin ameriške borovnice z ErM glivami

Teste ocene mikorizne kolonizacije smo izvedli na kupljenih sadikah korenin ameriške borovnice, sorte 'Bluecrop' (kontrola 0 let). Polovico korenin smo po spiranju z vodo shranili v 70 % etanol za kasnejše analize kolonizacije korenin z ErM glivami.

Pred ocenjevanjem kolonizacije smo korenine 10 do 30 minut, odvisno od njihove debeline, presvetljevali z 10 % KOH pri temperaturi 90 °C. Po presvetljevanju smo korenine sprali z vodo in jih zakisali z 1 N HCl za 5 minut pri sobni temperaturi. Po zakisanju smo korenine 10 minut barvali v 0,05 % raztopini tripan modro (v laktoglicerolu; glycerol : mlečna kislina : voda v masnem razmerju 80 : 40 : 40) prav tako pri temperaturi 90 °C. Ko smo korenine po barvanju dobro izprali z vodo, smo jih shranili v laktoglicerolu pri 4 °C do ocenjevanja kolonizacije. Od vseh kupljenih sort vzorčnih sadik, smo odvzeli nekaj kontrolnih sadik in pripravili korenine za oceno kolonizacije. Na objektna stekla smo zložili dele presvetljene in obarvane dele korenin in ocenili koloniziranost pod mikroskopom. Pripravili smo 30 preparatov iz štirih vzorčenih sort ('Bluecrop', 'Duke', 'Darrow' in 'Elliott'). Vsak preparat je imel od 5-6 ca. 1 cm dolgih

delčkov koreninic. Vizuelno smo ocenili ali so koreninske celice okužene z ErM hifami ali niso.

3.1.6 Bioinformatika in statistična analiza podatkov za poskus v nasadu ameriške borovnice

Kakovost pridobljenih sekvenc smo vizualno ocenili in odstranili sekvence začetnih oligonukleotidov v programu Genious verzija 5.5.7 (Drummond in sod., 2011). Sekvence smo primerjali z bazo podatkov NCBI (National Center for Biotechnology Information), in sicer z uporabo iskalnega algoritma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul in sod., 1990). Sekvence, ki niso pripadale glivam, smo izločili. Taksonomsko opredelitev gliv smo izvedli na podlagi taksonomske klasifikacije (RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2; Wang in sod., 2007) in taksonomske hierarhije (UNITE Fungal ITS s 95 % podobnostjo iz baze Ribosomal Database Project –RDP) (Wang in sod., 2007). Z uporabo iskalnega algoritma BLAST (Altschul in sod., 1990) smo primerjali sekvence iz naše raziskave z najbližjimi filogenetskimi sorodniki, prisotnimi v bazi NCBI. Sekvence smo poravnali z metodo ClustalW (Thompson in sod., 1997). Filogenetsko drevo smo sestavili z uporabo stohastičnega modela za zamenjavo nukleotidov Jukes-Cantor (Jukes in Cantor, 1969), distančne metode združevanja najbližjega sosedu »neighbor-joining« in z metodo vezanja »bootstrap« na podlagi 10.000 permutacij. Filogenetsko drevo smo koreninili z *Corallochytrium limacisporum*, bičkarjem ovratničarjem, kot zunanjikom (»outgroup«) vseh gliv (Vandenkoornhuysen in sod., 2002).

Statistično smo lahko analizirali le podatke iz jesenskega vzorčenja za leto 2013, ker smo le za to obdobje uspeli pridobiti zadostno število kvalitetnih sekvenc na vzorec za izvedbo statističnih analiz, medtem ko jih je bilo za izvedbo statističnih analiz za spomladansko in poletno vzorčenje premalo. Razlike v sestavi združbe gliv jesenskega vzorčenja (oktober 2013) med obema lokacijama (različno starima nasadoma ameriške borovnice) smo analizirali na podlagi Jaccardovega indeksa in jih vizualno prikazali z analizo nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (NMDS). Nemetrično večrazsežnostno lestvičenje spada med nedirektne gradientne analize. Metodo uporabimo, kadar je prikazovanje rezultatov v dveh ali treh dimenzijah bolj pomembno od prikazovanja dejanskih razdalj med objekti (Legendre in Legendre, 1998). Uporabili smo Jaccardov index, ki dobro operira s podatki z izdatnim številom ničel (Zuur in sod., 2007). Izbrali smo 10.000 permutacij, ki so bile ugnezde glede na vzorčna mesta.

Za določitev pripadnosti določeni skupini jesenskih vzorcev smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test. Podatke smo analizirali z uporabo statističnega jezika R (verzija 3.0.1) s standardnimi R knjižnicami in statističnim paketom »Rcmdr« (R Development Core Team, 2011).

3.2 LONČNI POSKUS

Pri drugem delu poskusa smo sadike treh različnih sort sadili v lonce, kjer smo spremljali razlike v rasti sadik glede na tip inokuluma (komercialni inokulum, naravni inokulum), gnojenje in škropljenje s pripravki Score 250 EC, Switch 62,5 WG in Signum. Rastlinski material (sadike ameriške borovnice) za lončni poskus je bil kupljen v Italiji, v drevesnici ViVai Piante Battistini v kraju Cesena, 20. 4. 2013

3.2.1 Zasnova poskusa

Lončni poskus je bil zasnovan v 6 obravnavanjih (162 sadik). V vsakem obravnavanju je bilo po 9 sadik sort 'Duke', 'Darrow' in 'Elliott'. Te smo potem razdelili še glede na gnojenje z gnojilom Substral Osmocote, in sicer 6 sadik od vsake sorte smo pognojili s polnim odmerkom in 3 sadike od vsake sorte s polovičnim odmerkom gnojila (glej poglavje Mineralno gnojilo). Tri obravnavanja so bila škropljena in tri neškropljena s pripravki Score 250 EC, Switch 62,5 WG in Signum (glej poglavje Fitofarmacevtska sredstva (FFS)). Uporabili smo tudi dva tipa inokuluma in sicer komercialni inokulum z erikoidnimi mikoriznimi glivami Rhodovit[®] (Symbiom, Republika Češka) in naravni inokulum, rizosferna tla gozdne borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), ki smo jih tik pred začetkom poskusa vzorčili na območju Borovnice v Jelah (Slika 4, preglednica 3). Za substrat smo uporabili naravno belo šoto, Klasmann Baltica, ki je bila kupljena v specializirani trgovini Cvetlice Dornig d.o.o., v Ljubljani, s pH vrednostjo med 3,5 in 4,5, ki je najbolj primerna za dobro rast ameriške borovnice. Šota je razkužena, tako da ne vsebuje kaljivih semen, patogenov in škodljivcev in ne vsebuje dodatnih gnojil. Zaradi kraje velikega števila kupljenih sadik smo morali poskus zastaviti z manjšim številom vzorcev kot je bilo mišljeni prvotno. Zato smo za preverjanje vpliva gnojenja vzeli 6 polno in 3 polovično gnojene sadike.

Preglednica 3: Zasnova poskusa po obravnavanjih za vsako sorto.

Table 3: The design of the experiment by treatments for each variety.

Sorta	Inokulum	Polno gnojene	Polovično gnojene	FFS	Skup. št. sadik
'Duke'	Rhodovit [®]	6	3	DA	9
	Rhodovit [®]	6	3	NE	9
	Brez inok.	6	3	DA	9
	Brez inok.	6	3	NE	9
	Gozd. Inok.	6	3	DA	9
	Gozd. Inok.	6	3	NE	9
'Darrow'	Rhodovit [®]	6	3	DA	9
	Rhodovit [®]	6	3	NE	9
	Brez inok.	6	3	DA	9
	Brez inok.	6	3	NE	9
	Gozd. Inok.	6	3	DA	9
	Gozd. Inok.	6	3	NE	9
'Elliott'	Rhodovit [®]	6	3	DA	9
	Rhodovit [®]	6	3	NE	9
	Brez inok.	6	3	DA	9
	Brez inok.	6	3	NE	9
	Gozd. Inok.	6	3	DA	9
	Gozd. Inok.	6	3	NE	9

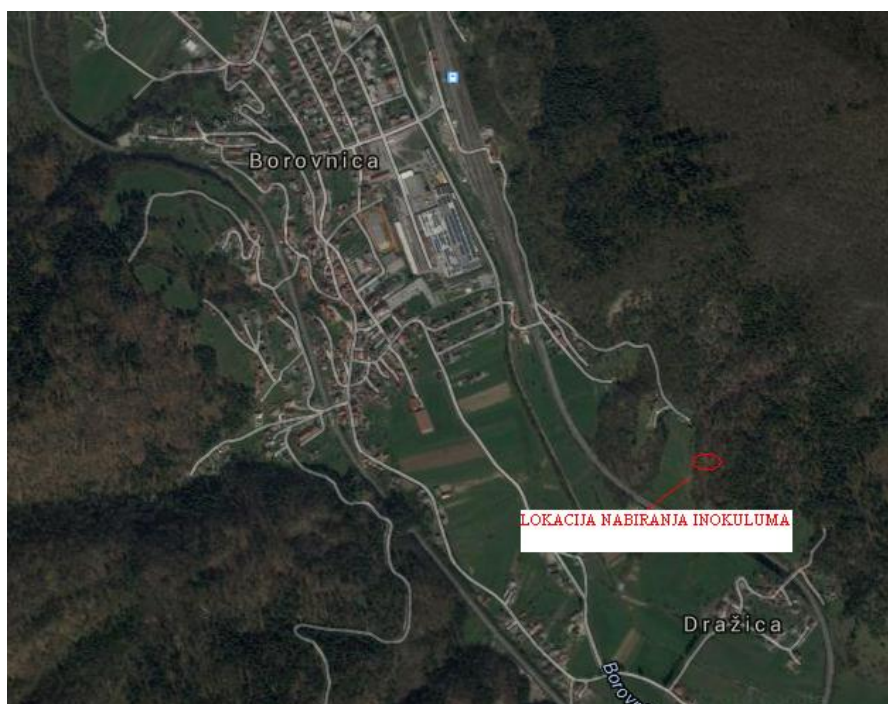
Uporabljene sorte ameriške borovnice:

- Sorta 'Duke' ima gosto, močno in pokončno rast. Ogrodne veje so le zmerno razvejane. Listje je majhno in srednje gosto. Zori zgodaj, že konec junija. Pridelek je velik in reden. Plodovi so srednje debeli do zelo debeli in rahlo sploščeni z veliko obstojnega poprha. Jagode so čvrste in sladko-kislega okusa. Sorta je odporna na nizke temperature.
- Sorta 'Darrow' ima pokončno in bujno rast. Listje je manjše in ne tako gosto. Zori v sredini in koncu julija. Pridelek je zelo velik. Plodovi so čvrsti, debeli in sladko-kislega okusa. Sorta dobro prenaša sušo in je dokaj odporna na mraz.
- Sorta 'Elliott' ima pokončno in srednje visoko rast. Listje podolgovato in ostro koničasto. Zori zelo pozno, v začetku avgusta. Plodovi so srednje debeli z izrazitim poprhom. Meso je čvrsto in rahlo kislega okusa.

Priprava inokuluma

Uporabili smo dva različna tipa inokuluma. Prvi je bil komercialni inokulum Rhodovit[®] (Symbiom, Republika Češka). To je izdelek, ki vsebuje propagule erikoidnih mikoriznih gliv, primernih za rastline in družine vresovk, med katere spada tudi ameriška borovnica. Produkt je tekoči izolat, ki po specifikaciji proizvajalca vsebuje tudi naslednje dodatke

(fino šoto, granule, ki zadržujejo vodo, keratin in minerale). Vsebuje tri vrste erikoidnih mikoriznih gliv in sicer: *Oidiodendron maius*, *Hymenoscyphus ericae* sev 1 in *Hymenoscyphus ericae* sev 2 (Symbiom, Republika Češka, glej specifikacijo produkta v prilogi 4). Mešanico erikoidnih mikoriznih gliv smo pripravili, tako da smo vsebino vrečke zmešali z 1 litrom vode in vsebino premešali (po navodilih proizvajalca). Dne 26. 4. 2013, smo vsaki sadiki dodali 40 ml mešanice inokuluma, tako da smo v sadilno jamo zlili del tekočega medija. V jamico smo dali sadiko in nato polili po vrhu koreninske grude še drugi del medija in nato vse skupaj zasuli s šoto. Za naravni inokulum smo uporabili rizosferna tla gozdnih borovnic, ki smo jo izkopali okoli korenin gozdnih borovnic v bližnjem gozdu v Jelah v Borovnici (koordinate lokacije so 45°54'45.8"N 14°22'32.8"E, po Google Earth, 2015) (Slika 4). Rizosferna tla smo dobro premešali, da smo dobili čim bolj homogen inokulum. Dne 26. 4. 2013 smo v vsak lonec naredili sadilno jamico in vanjo dali 35 g mešanice naravnega inokuluma. Nato smo dodali sadiko in vse skupaj zasuli s šoto. Suha masa mešanice inokuluma, ki smo ga dodali v vsak lonček je bila 11 g.



Slika 4: Lokacija nabiranja inokuluma v obliki rizosfernih tal navadne gozdne borovnice (*Vaccinium myrtillus*) za potrebe lončnega poskusa (Google Maps, 2015).

Figure 4: Location of inoculum collecting – rhizosphere soil of ordinary blueberries (*Vaccinium myrtillus*) for the needs of pot experiment (Google Maps, 2015).

Mineralno gnojilo

Za lončni poskus smo uporabili gnojilo Osmocote (Substral), ki je dolgotrajno specialno gnojilo za jagodičevje. Gnojenje smo razdelili v dva tipa, in sicer: celoten preračunan odmerek glede na površino lonca (2 g na lonec) in polovičen odmerek (1 g na lonec) glede na površino lonca. Pognojili smo enkrat v sezoni (prvič 26. 4. 2013), ker je gnojilo počasi sproščujoče (se sprošča 6 mesecev) in drugič 20. 4. 2014. Sestava gnojila je bila: NPK (Mg) 11-11-19-(2). Od skupnega dušika je bilo 5 % v nitratni obliki in 6 % v amonijski obliki. Fosfor je bil v obliki fosforjevega pentaoksida (P_2O_5), topnega v nevtralnem amonijevemu citratu in vodi. Kalij je bil v obliki kalijevega oksida (K_2O), topnega v vodi. Magnezij je bil v obliki magnezijevega oksida (MgO). Mikrohranila so bila: bor, baker, železo, mangan, molibden in cink (odstotek ni znan).

Fitofarmacevtska sredstva (FFS)

Za lončni poskus smo uporabili enaka škropiva (FFS), kot se jih uporablja za zaščito v nasadih (glej poglavje Zaščita pred boleznimi). Tretiranje se je začelo s pripravkom Score 250 EC in sicer prvič 28. 4. 2013, drugič 10. 5. 2013 v kombinaciji s pripravkom Switch 62,5 WG. Tretje tretiranje je bilo opravljeno 25. 5. 2013, in sicer s pripravkoma Switch 62,5 WG in Sygnum. V letu 2014, smo uporabili enaka škropiva, in sicer prvič Score 250 EC 20. 4. 2014, drugič Score 250 EC in Switch 62,5 WG, 8. 5. 2014 in tretjič 29. 5. 2014, Switch 62,5 WG in Sygnum. Polovica obravnavanj je bila zaščitena pred tretiranjem, polovica je bila tretirana (glej poglavje 3.2.1 Zasnova poskusa).

3.2.2 Meritve števila in dolžine poganjkov na rastlinah iz lončnega poskusa

Pri rastlinah iz lončnega poskusa smo merili dolžino in število poganjkov, ter ocenili kolonizacijo korenin z ErM. Nekatere študije navajajo tudi uporabo analiz vsebnosti hranil v koloniziranih in nekoloniziranih rastlinah po segmentih, in sicer vsebnost hranil v sušenih listih, v sušenih steblih in v sušenih koreninah (Scagel, 2005), ali vrednotijo rast rastlin z meritvami mase. Ker nismo smeli narediti veliko škode z uničenjem rastlin, ker so bile le te kupljene za sajenje na novo pripravljene površine nasada, tovrstnih analiz in meritev nismo opravljali..

Število in dolžina poganjkov

Štetje poganjkov in meritve dolžino novih poganjkov smo izvajali enkrat mesečno tekom celotnega obdobja trajanja poskusa (od 26. 4. 2013 do 20. 9. 2014), skupaj 12 merjenj števila poganjkov in 11 merjenj dolžine poganjkov, glej preglednico 4). Na dan sajenja rastlin (26. 4. 2013) smo najprej prešteli, koliko poganjkov so imele sadike v času

sajenja. V tem času dolžine poganjkov nismo mogli izmeriti, ker so bili na rastlinah samo brsti. Merilo in štelo se je samo poganjke, ki so zrastle iz brstov, ki so bili na »ogrodnih«
 vejah (skica spodaj). Od 22. 5. 2013 naprej smo merili dolžino poganjkov.

Preglednica 4: Datumi vzorčenja števila in dolžine novih poganjkov pri lončnem poskusu.
 Table 4: Dates of sampling the number and length of new shoots in the pot experiment.

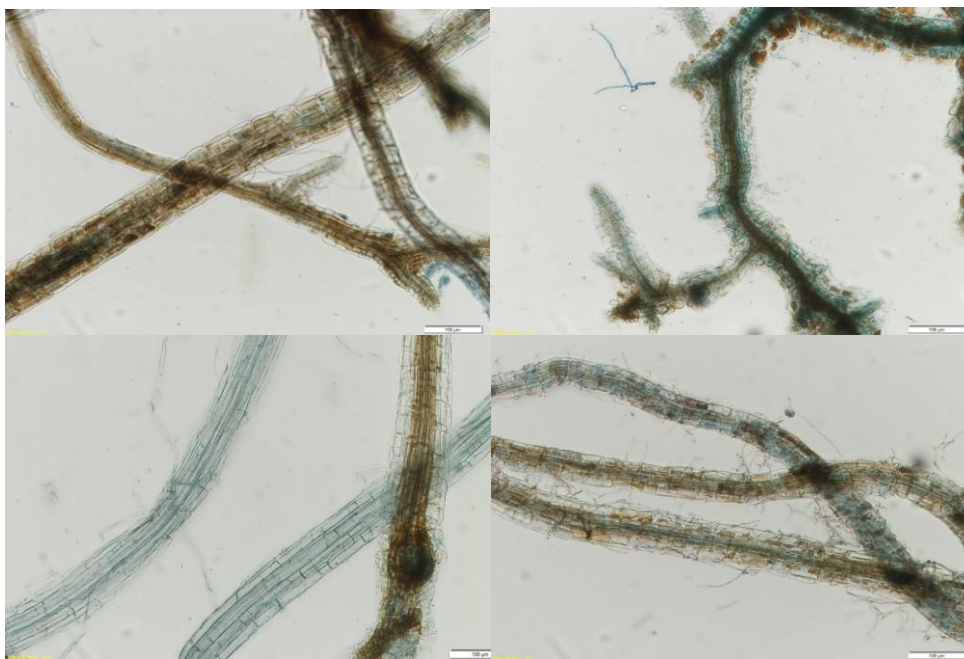
Zaporedno vzorčenje	Datum
1	26. 4. 2013
2	10. 5. 2013
3	10. 6. 2013
4	10. 7. 2013
5	10. 8. 2013
6	10. 9. 2013
7	26. 4. 2014
8	22. 5. 2014
9	25. 6. 2014
10	30. 7. 2014
11	25. 8. 2014
12	20. 9. 2014

3.2.3 Bioinformatika in statistična analiza podatkov za lončni poskus

Za primerjanje povprečnih vrednosti števila in dolžin poganjkov med obravnavanji za vsak datum vzorčenja posebej, smo uporabili enosmerno ANOVO. Kjer je bila razlika statistično značilna smo uporabili Tukeyeve kontraste, da smo določili povprečno razliko znotraj posameznega datuma vzorčenja. Za preučevanje vpliva gnojenja in inokuluma na dolžino in število poganjkov, za vsak datum vzorčenja, smo uporabili večsmerno ANOVO. Statistična analiza podatkov je bila narejena s paketom »Rcmdr« programskega jezika R, verzije 3.0.1 (R Development Core Team, 2011).

4 REZULTATI

Pri ocenjevanju kolonizacije kupljenih sadik sort 'Bluecrop', 'Duke', 'Darrow' in 'Elliott', smo pregledu 30 preparatov korenin kupljenih sadik, ugotovili, da niso bile kolonizirane z ErM glivami. V večini primerov so bile korenine prazne, v nekaterih pa smo našli hife, ki bi lahko pripadale glivam DSE, vendar jih tudi z molekularnimi tehnikami nismo potrdili. V nekaterih primerih pa smo videli, da je ostal lignin v koreninah obarvan in nismo mogli oceniti ali so korenine prazne ali so kolonizirane.



Slika 5: Korenine kupljenih sadik ameriške borovnice sorte 'Bluecrop', 'Duke', 'Darrow' in 'Elliott' pod mikroskopom (korenine niso kolonizirane z ErM glivami (slika c), na sliki a, b in d so vidne hife gliv, ki jih nismo mogli indentificirati). Na vseh štirih slikah je tudi nerazbarvan lignin.

Figure 5: Roots of seedlings of highbush blueberry cultivar 'Bluecrop' uder the microscope (roots are not colonised with ErM fungi (figure c), on figure a, b and d, are visible hyphae of fungi, wich we couldn't identified). On the all four figures it is also discolored lignin.

4.1 POSKUS V NASADU

Skupno smo odvzeli 47 koreninskih vzorcev ameriške borovnice, iz katerih smo uspešno izolirali celokupno DNK. Od 47 vzorcev celokupne DNK, smo uspešno namnožili potencialne markerske gene za erikoidne mikorizne gliv iz 28 vzorcev, medtem ko pomnoževanje iz ostalih vzorcev ni bilo uspešno. Enako velja tudi za vse vzorce kupljenih sadik (korenine niso vsebovale DNK gliv). Iz 28 vzorcev z uspešno amplifikacijo potencialnih markerjev erikoidnih mikoriznih gliv smo s kloniranjem pridobili 566 klonov in nato na podlagi dolžine pomnoženega fragmenta izločili tiste neustrezne dolžine. Tako smo dobili 22 vzorcev z ustrezno dolžino fragmenta (850 bp), kar je predstavljalo skupno 211 klonov.

Iz vseh klonskih knjižnic smo skupno analizirali 211 sekvenc, med katerimi je 87 sekvenc (41 %) pripadalo kraljestvu gliv in 6 sekvenc (3 %) kraljestvu bakterij. Ostalih 118 sekvenc (56 %) ni vsebovalo inserta ali pa so bile preslabe kvalitete.

Največ sekvenc (37) (preglednica 4) smo pridobili iz vzorcev korenin iz 30 let starega nasada (lokacija 1) vzorčenih jeseni 2013, 14 sekvenc je bilo iz 18 let starega nasada (lokacija 2). V vzorcih korenin iz 30 let starega nasada (lokacija 1) vzorčenih spomladi 2014 smo identificirali le eno sekvenco gliv, iz spomladanskih vzorcev vzorčenih iz lokacije 2 pa 9 sekvenc. V poletnih vzorcih iz lokacije 1 smo identificirali 9 sekvenc, v vzorcih iz lokacije 2 pa 17 sekvenc.

Preglednica 5: Število sekvenc gliv po posameznih vzorcih (V- pomeni vzorec) po času vzorčenja in po lokaciji vzorčenja. Kontrola so grmi zaščiteni pred FFS.

Table 5: Number of sequences of fungi for each sample (V - means a sample) by the sampling time and location of sampling. Controls are bushes, which are protected against PPP.

Lokacija	Jesen 2013					Pomlad 2014	Pomlad 2014 kontrola	Poletje 2014	Poletje 2014 kontrola
1 (starejši)	V6	V7	V8	V9	V52			V58	V63
Št. sekvenc	18	6	7	6	1		0	8	1
2 (mlajši)	V11	V13	V41	V42	V48	V68		V69	V72
Št. sekvenc	6	8	2	4	3	9		7	1

Vseh 87 sekvenc gliv spada v deblo Basidiomycota in razred Agaricomycetes. Znotraj razreda imamo 3 redove, in sicer red Trechisporales (43 sekvenc), red Agaricales (33 sekvenc) in red Cantharellales (1 sekvenca). Treh sekvenc nismo mogli uvrstiti v noben red, saj je bil prag zaupanja pod 82 %. Med bakterijskimi sekvencami smo identificirali bakterije iz debla Proteobacteria in razreda Alphaproteobacteria (6 sekvenc) (preglednica 6).

Preglednica 6: Število sekvenc po klasifikaciji gliv in bakterij.

Table 6: The number of sequences according to the classification of fungi and bacteria.

Debilo	Razred	Red	Družina	Št. sekvenc
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Mycenaceae	31
			Tricholomataceae	2
		Cantharellales	Hydnaceae	1
		Trechisporales	Hydnodontaceae	7
		Trechisporales	neidentificirane	43
		neidentificirane	Trechisporales	9
			Agaricomycetes	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria			6

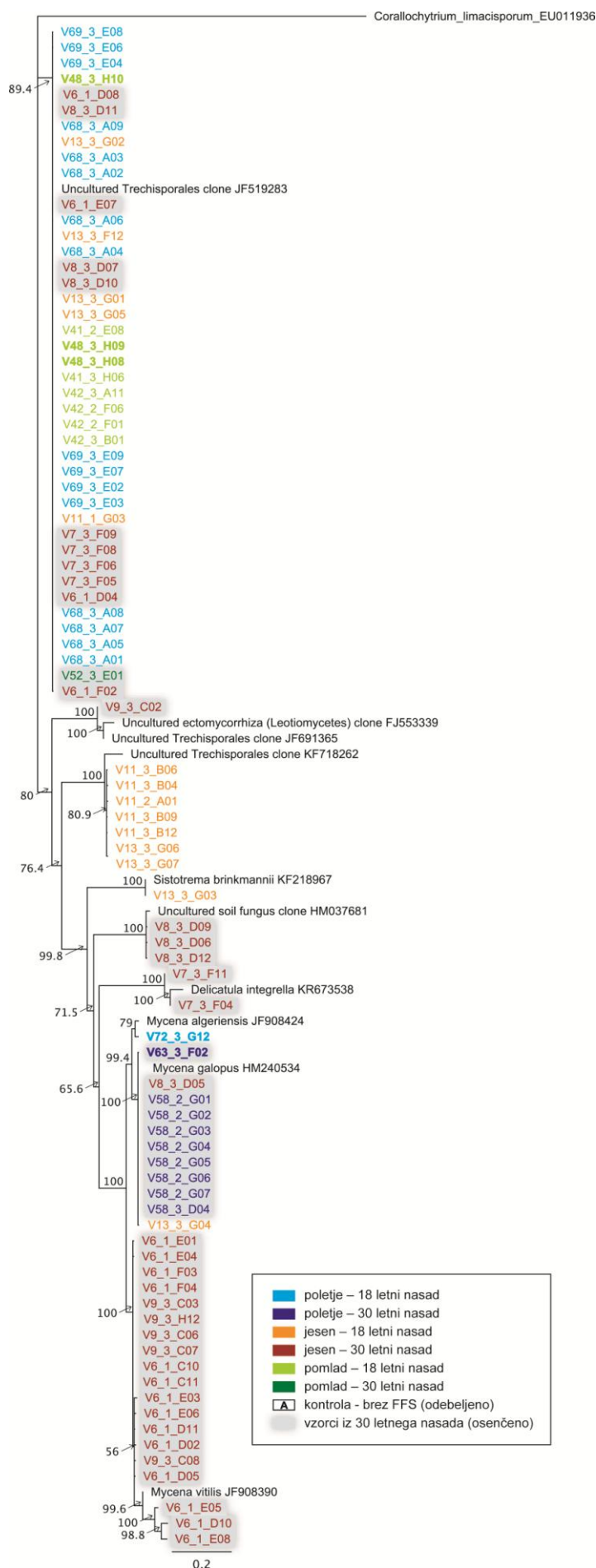
V jesenskih vzorcih iz lokacije 1 je 22 sekvenc gliv pripadalo redu Agaricales, 12 sekvenc redu Trechisporales, od tega jih 20 spada v družino Mycenaceae, 2 sekvenci pa spadata v družino Tricholomataceae. V jesenskih vzorcih iz lokacije 2 je bila ena sekvenca iz reda Cantharellales (družina Hydnaceae) in ena sekvenca iz reda Agaricales (družina Mycenaceae). 12 sekvenc je pripadalo redu Trechisporales, od tega jih 7 spada v družino Hydnodontaceae, medtem ko 5 sekvencam nismo uspeli določiti družine. V spomladanskih vzorcih iz lokacije 1 smo določili samo eno sekvenco, ki spada v red Trechisporales, medtem ko jih je bilo na 2 lokaciji 9 iz reda Trechisporales. V poletnih vzorcih iz lokacije 1 je bilo 9 sekvenc iz reda Agaricales, medtem ko je bila iz lokacije 2 samo 1 sekvenca in 16 sekvenc iz reda Trechisporales in ena sekvenca iz reda Agaricales.

Iz družine Mycenaceae smo identificirali tri predstavnike, in sicer *Mycena vitilis* (19 sekvenc), *Mycena galopus* (11 sekvenc) in *Mycena algeriensis* (1 sekvenca). Iz družine Tricholomataceae smo identificirali enega predstavnika, in sicer glivo *Delicatula integrilla* (ena sekvenca). Iz družine Hydnaceae smo identificirali enega predstavnika, in sicer glivo *Sistotrema brinkmannii* (ena sekvenca). Iz reda Trechisporales smo dobili 43 sekvenc, ki jih nismo mogli uvrstiti v nobeno družino in nismo našli predstavnikov (sekvence klonov Trechisporales) (slika 6).

Preglednica 7: Klasifikacija sekvenc glede na čas vzorčenja za obe lokaciji.

Table 7: Classification of sequences according to the sampling time for both locations.

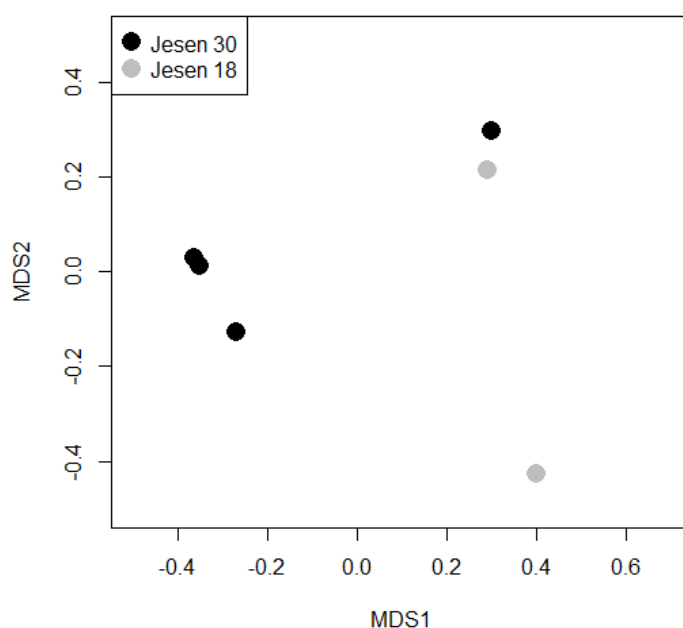
Lokacija 1	Red	Družina	Vrsta	Št. sekvenc
Jesen 2013	Agaricales	Mycenaceae	<i>Mycena vitilis</i>	19
			<i>Mycena galopus</i>	1
	Trechisporales	Tricholomataceae	<i>Delicatula integrella</i>	2
				12
Pomlad 2014	Trechisporales			1
Poletje 2014	Agaricales	Mycenaceae	<i>Mycena galopus</i>	9
Lokacija 2	Red	Družina	Vrsta	Št. sekvenc
Jesen 2013	Agaricales	Mycenaceae	<i>Mycena galopus</i>	1
	Cantharellales	Hydnaceae	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	1
	Trechisporales	Hydnodontaceae		7
	Trechisporales neident.			5
Pomlad 2014	Trechisporales			9
Poletje 2014	Agaricales	Mycenaceae	<i>Mycena algeriensis</i>	1
	Trechisporales			16



Slika 6: Filogenija gliv vzorčenih na lokaciji 1 (30 let) in lokaciji 2 (18 let) na območju Ljubljanskega barja. Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distančne metode združevanja najbližjega sosed (»neighbor joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (>bootstrap values«) s 10.000 permutacijami. S temno rdečo barvo so označeni vzorci (V6, V7, V8, V9) jesenskega vzorčenja (oktober) (30 let), z oranžno barvo so označeni vzorci (V11, V13) jesenskega vzorčenja (oktober) (18 let), s temno zeleno barvo je označen vzorec (V52) spomladanskega vzorčenja (april) (30 let), s svetlo zeleno barvo vzorci (V41, V42) spomladanskega vzorčenja (april) (18 let), s temno modro barvo je označen vzorec (V58) poletnega vzorčenja (junij) (30 let) in s svetlo modro so označeni vzorci (V68, V69) poletnega vzorčenja (junij) (18 let). Odebeljeno besedilo predstavlja vzorce (V48, V63, V72), ki niso bili škropljeni in predstavljajo kontrolne grme spomladanskega in poletnega vzorčenja.

Figure 6: Neighbor-joining phylogeny of fungi recorded at location 1 (30 years old) and location 2 (18 years old). Bootstrap values (10'000 replicates) are shown above the branches and before the node to which they correspond. With the dark red color are marked samples (V6, V7, V8, V9) of autumn sampling (October) (30 years), with the orange color are marked samples (V11, V13) of autumn sampling (October) (18), with the dark green color is marked sample (V52) of spring sampling (April) (30 years), with the bright green color are marked samples (V41, V42) of spring sampling (April) (18), with the dark blue color is marked sample (V58) of summer sampling (June) (30 years) and with the light blue are marked samples (V68, V69) of summer sampling (June) (18). Bold text represents samples (V48, V63, V72) that have not been sprayed and represent the control shrubs of spring and summer sampling.

Ordinacijski graf nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja kaže, da imamo dve skupini združb gliv, ki se med seboj statistično značilno razlikujeta ($p = 0,04953$, Kruskal-Wallisov test). Ena skupina (levo) so združbe gliv iz jesenskega vzorčenja lokacije 1 (30 let), druga skupina (desno), so združba gliv iz jesenskega vzorčenja lokacije 2 (18 let) in osamelec lokacije 1. Skupine so narejene po NMDS osi 1 (slika 7).



Slika 7: Ordinacijski graf nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja prikazuje razporeditev jesenskih vzorcev iz 30 (lokacija 1) in 18 let starega nasada (lokacija 2) v dve značilno različni skupini, razen enega vzorca, ki je bližje vzorcem iz 18 let starega nasada (lokacija 2).

Figure 7: NMDS ordination shows the layout of the autumn samples from 30 (location 1) and the 18-year-old plantation (location 2) into two separate groups, with the exception of one sample, which is closer to the model of the 18-year-old plantation (location 2).

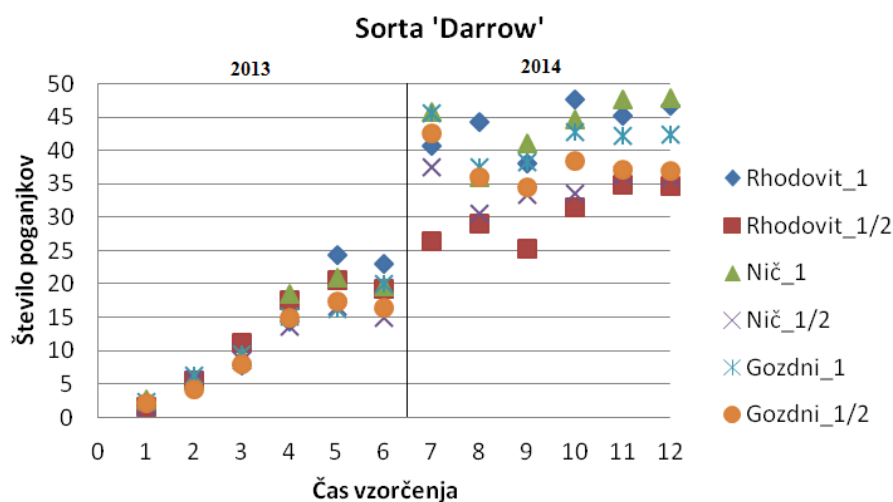
4.2 LONČNI POSKUS

Pri lončnem poskusu smo analizirali 3 sorte ameriške borovnice ('Duke', 'Darrow' in 'Elliott') in sicer na podlagi tipa inokuluma, gnojenja in uporabe FFS. Uporabili smo kupljen inokulum za vresovke in pa inokulum iz rizosfernih tal navadne gozdne borovnice. En del poskusa pa je bil brez dodanega inokuluma. Gnojenje smo razdelili na polno doziranje (6 loncev vsake sorte) in polovično gnojenje (3 lonci vsake sorte). Zadnji del je bila uporaba FFS, in sicer polovica grmov vsake sorte je bila tretirana, polovica je bila netretirana s FFS (glej poglavje 3.2.1. Zasnova poskusa).

4.2.1 Primerjave povprečnih vrednosti za število poganjkov po datumih vzorčenja

Spodaj so predstavljeni podatki statističnih razlik povprečnih vrednosti za število poganjkov med obravnavanji, po datumih izvedenih meritev, za vsako sorto (preglednica 8) (Tukeyev test). Spremenljivko uporaba fitofarmacevtskih sredstev, smo izločili iz statistične analize (večsmerna ANOVA), ker ni imela statistično značilnega vpliva na število poganjkov. Za nadaljnje analize smo uporabili samo spremenljivki gnojenje in inokulum.

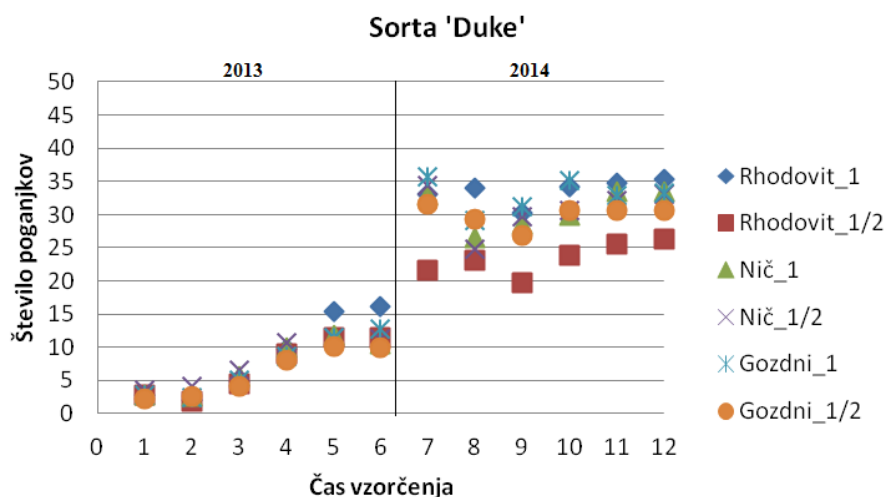
Pri sorti 'Darrow' za leto 2013 (26. 4. 2013, 10. 5. 2013, 10. 6. 2013, 10. 7. 2013, 10. 8. 2013, 10. 9. 2013) ni statistično značilnih razlik v številu poganjkov med obravnavanji. V rastni sezoni 2014 so se pojavile statistično značilne razlike pri obravnavanju Rhodovit[®]-polovično gnojen in ostalimi obravnavanji, in sicer število poganjkov je bilo statistično značilno manjše od ostalih obravnavanj. Tudi pri sorti 'Duke' je bila podobna situacija, vendar so se začele pojavljati statistično značilne razlike med obravnavanji proti koncu rastne sezone 2013 in v prvih treh vzorčenjih v letu 2014. Pri sorti 'Elliott' smo statistično značilne razlike med obravnavanji izmerili prvič 10. 8. 2013.



Legenda: 1 – polni odmerek gnojila, 1/2 – polovični odmerek gnojila, Rhodovit, Gozdni – vrsta inokuluma, Nič – brez inokuluma.

Slika 8: Slika prikazuje število poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Darrow'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi je prikazano število poganjkov.

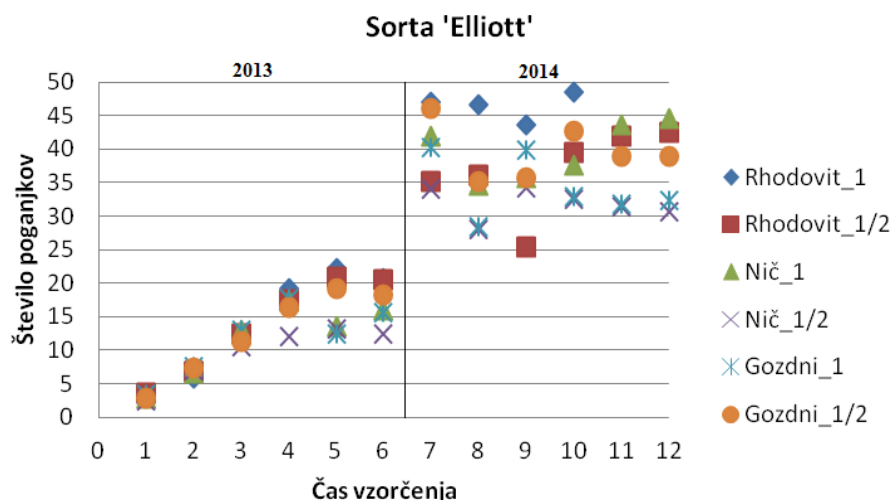
Figure 8: The figure shows the number of shoots for individual treatment for cultivar 'Darrow'. The x-axis shows the consecutive sampling (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), the y-axis shows the number of the shoots.



Legenda: 1 – polni odmerek gnojila, 1/2 – polovični odmerek gnojila, Rhodovit, Gozdni – vrsta inokuluma, Nič – brez inokuluma.

Slika 9: Slika prikazuje število poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Duke'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi je prikazano število poganjkov.

Figure 9: The figure shows the number of shoots for individual treatment for cultivar 'Duke'. The x-axis shows the consecutive sampling (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), the y-axis shows the number of the shoots.



Legenda: 1 – polni odmerek gnojila, ½ - polovični odmerek gnojila, Rhodovit, Gozdni – vrsta inokuluma, Nič – brez inokuluma.

Slika 10: Slika prikazuje povprečno število poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Elliott'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi je prikazano število poganjkov.

Figure 10: The figure shows the number of shoots for individual treatment for cultivar 'Elliott'. The x-axis shows the consecutive sampling (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 26. apr. 2014, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), the y-axis shows the number of the shoots.

Preglednica 8: Podatki o številu poganjkov za posamezno obravnavanje (Rhodovit[®], brez inokuluma in gozdni inokulum). Prikazani so podatki o gnojenju, o sortah in datum vzorčenja. Podane vrednosti so povprečja $\pm$ standardni odklon. Povprečne vrednosti v istem stolpcu brez enake skupne črkovne oznake (a, b, c) so med seboj statistično različne ($P < 0,05$; test mnogoterih primerjav Tukeyevi kontrasti).

Table 8: Data of the number of shoots per treatment (Rhodovit[®] without inoculum and forest inoculum). Data of fertilizer treatment, cultivars and date of sampling. Note that the values are the mean values $\pm$ standard deviation. Means within a row without common superscript letter (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey's contrasts.

Povprečno število poganjkov ($\pm$ SD)								
'Darrow'	inokulum	gnojene	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
	Rhodovit [®]	polno	1,66 $\pm$ 0,65 ^a	4,58 $\pm$ 2,31 ^a	7,83 $\pm$ 4,56 ^a	14,50 $\pm$ 5,76 ^a	24,33 $\pm$ 11,07 ^a	23,00 $\pm$ 9,56 ^a
	Rhodovit [®]	polovično	1,66 $\pm$ 0,75 ^a	5,50 $\pm$ 2,50 ^a	11,16 $\pm$ 3,65 ^a	17,66 $\pm$ 6,28 ^a	20,66 $\pm$ 5,35 ^a	19,33 $\pm$ 5,08 ^a
	Brez inok.	polno	2,83 $\pm$ 1,52 ^a	5,50 $\pm$ 2,50 ^a	9,08 $\pm$ 4,01 ^a	18,58 $\pm$ 6,54 ^a	21,00 $\pm$ 5,22 ^a	19,58 $\pm$ 5,77 ^a
	Brez inok.	polovično	1,66 $\pm$ 0,81 ^a	5,66 $\pm$ 2,58 ^a	8,66 $\pm$ 1,86 ^a	13,66 $\pm$ 3,01 ^a	16,66 $\pm$ 6,74 ^a	15,00 $\pm$ 5,55 ^a
	Gozd. inok.	polno	2,41 $\pm$ 1,67 ^a	6,41 $\pm$ 4,31 ^a	9,50 $\pm$ 4,25 ^a	15,08 $\pm$ 4,87 ^a	16,33 $\pm$ 9,57 ^a	20,00 $\pm$ 8,25 ^a
	Gozd. inok.	polovično	2,1 $\pm$ 0,75 ^a	4,33 $\pm$ 1,96 ^a	8,00 $\pm$ 4,19 ^a	15,00 $\pm$ 4,85 ^a	17,33 $\pm$ 5,85 ^a	16,50 $\pm$ 4,84 ^a
	inokulum	gnojene	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
	Rhodovit [®]	polno	40,66 $\pm$ 9,17 ^b	44,25 $\pm$ 8,21 ^b	38,08 $\pm$ 8,98 ^b	47,75 $\pm$ 11,32 ^b	45,25 $\pm$ 9,19 ^a	46,83 $\pm$ 8,58 ^{ab}
	Rhodovit [®]	polovično	26,50 $\pm$ 6,34 ^a	29,00 $\pm$ 6,89 ^a	25,33 $\pm$ 3,77 ^a	31,50 $\pm$ 7,53 ^a	34,83 $\pm$ 7,83 ^a	34,66 $\pm$ 7,86 ^a
	Brez inok.	polno	45,83 $\pm$ 6,93 ^b	36,00 $\pm$ 7,57 ^{ab}	41,16 $\pm$ 9,62 ^b	44,58 $\pm$ 8,79 ^{ab}	47,66 $\pm$ 11,96 ^a	47,83 $\pm$ 11,24 ^b
	Brez inok.	polovično	37,50 $\pm$ 8,75 ^{ab}	30,66 $\pm$ 4,58 ^a	33,33 $\pm$ 8,52 ^{ab}	33,66 $\pm$ 6,83 ^a	36,33 $\pm$ 8,06 ^a	36,00 $\pm$ 7,75 ^{ab}
	Gozd. inok.	polno	45,58 $\pm$ 12,63 ^b	37,58 $\pm$ 6,51 ^{ab}	38,25 $\pm$ 8,50 ^b	42,83 $\pm$ 9,77 ^{ab}	42,25 $\pm$ 8,59 ^a	42,33 $\pm$ 7,84 ^{ab}
	Gozd. inok.	polovično	42,66 $\pm$ 7,91 ^b	36,00 $\pm$ 5,76 ^{ab}	34,50 $\pm$ 7,36 ^{ab}	38,50 $\pm$ 6,28 ^{ab}	37,16 $\pm$ 7,67 ^a	37,00 $\pm$ 7,24 ^{ab}
'Duke'	inokulum	gnojene	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
	Rhodovit [®]	polno	2,83 $\pm$ 1,19 ^a	1,91 $\pm$ 1,50 ^a	4,75 $\pm$ 2,37 ^a	9,66 $\pm$ 4,52 ^a	15,33 $\pm$ 7,48 ^a	16,16 $\pm$ 7,37 ^a
	Rhodovit [®]	polovično	2,83 $\pm$ 0,98 ^a	1,83 $\pm$ 1,33 ^a	4,50 $\pm$ 1,76 ^a	9,00 $\pm$ 5,06 ^a	11,33 $\pm$ 3,67 ^a	11,33 $\pm$ 3,72 ^{ab}
	Brez inok.	polno	2,75 $\pm$ 0,86 ^a	2,50 $\pm$ 1,62 ^a	5,58 $\pm$ 2,23 ^a	9,83 $\pm$ 2,25 ^a	11,75 $\pm$ 3,54 ^a	10,50 $\pm$ 2,35 ^b
	Brez inok.	polovično	3,50 $\pm$ 1,04 ^a	4,00 $\pm$ 1,55 ^a	6,50 $\pm$ 2,17 ^a	10,66 $\pm$ 2,50 ^a	11,33 $\pm$ 2,80 ^a	11,16 $\pm$ 2,92 ^{ab}

Se nadaljuje

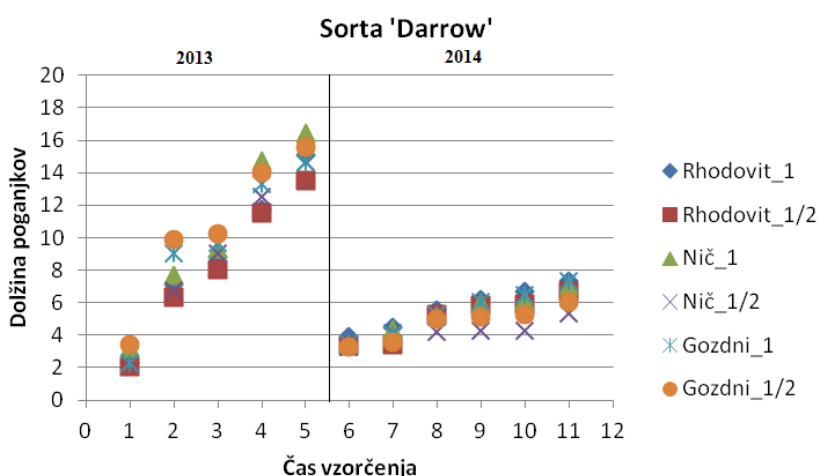
Nadaljevanje preglednice 8: Podatki o številu poganjkov za posamezno obravnavanje (Rhodovit[®], brez inokuluma in gozdni inokulum).

Povprečno število poganjkov (± SD)								
'Duke'	inokulum	gnojene	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
	Gozd. inok.	polno	2,83 ± 0,83 ^a	2,33 ± 1,43 ^a	5,00 ± 2,04 ^a	8,50 ± 2,90 ^a	11,42 ± 2,06 ^a	12,75 ± 3,30 ^{ab}
	Gozd. inok.	polovično	2,16 ± 0,75 ^a	2,50 ± 2,58 ^a	4,16 ± 1,33 ^a	8,00 ± 1,67 ^a	10,00 ± 1,78 ^a	9,83 ± 3,06 ^{ab}
	inokulum	gnojene	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
	Rhodovit [®]	polno	33,08 ± 8,53 ^b	33,91 ± 7,21 ^b	30,25 ± 10,44 ^{ab}	34,16 ± 9,85 ^a	34,75 ± 8,47 ^a	35,33 ± 8,58 ^a
	Rhodovit [®]	polovično	21,50 ± 8,31 ^a	23,00 ± 8,92 ^a	19,66 ± 6,28 ^a	23,83 ± 11,63 ^a	25,50 ± 12,24 ^a	26,33 ± 12,14 ^a
	Brez inok.	polno	32,75 ± 6,62 ^b	26,41 ± 5,58 ^a	28,50 ± 5,77 ^{ab}	29,75 ± 5,49 ^a	33,33 ± 6,42 ^a	33,3 ± 6,40 ^a
	Brez inok.	polovično	34,33 ± 8,94 ^b	24,83 ± 6,14 ^a	29,66 ± 5,95 ^{ab}	30,50 ± 8,40 ^a	32,16 ± 6,21 ^a	33,00 ± 6,66 ^a
	Gozd. inok.	polno	35,66 ± 6,62 ^b	29,00 ± 3,97 ^{ab}	31,16 ± 6,08 ^b	35,00 ± 6,39 ^a	32,83 ± 5,78 ^a	33,16 ± 5,55 ^a
	Gozd. inok.	polovično	31,50 ± 5,75 ^{ab}	29,33 ± 4,17 ^{ab}	26,83 ± 5,23 ^{ab}	30,66 ± 6,02 ^a	30,50 ± 5,35 ^a	30,66 ± 5,04 ^a
'Elliott'	inokulum	gnojene	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
	Rhodovit [®]	polno	3,25 ± 1,21 ^a	5,75 ± 2,49 ^a	11,66 ± 4,16 ^a	19,08 ± 7,76 ^a	22,08 ± 4,87 ^b	20,58 ± 5,58 ^b
	Rhodovit [®]	polovično	3,50 ± 1,05 ^a	6,66 ± 1,21 ^a	12,33 ± 0,76 ^a	17,50 ± 8,14 ^a	20,83 ± 5,30 ^{ab}	20,50 ± 6,44 ^{ab}
	Brez inok.	polno	2,83 ± 0,94 ^a	6,50 ± 3,20 ^a	12,91 ± 5,26 ^a	17,25 ± 3,91 ^a	13,41 ± 7,25 ^{ab}	16,00 ± 3,62 ^{ab}
	Brez inok.	polovično	2,33 ± 0,51 ^a	6,83 ± 1,72 ^a	10,50 ± 2,25 ^a	12,00 ± 2,09 ^a	13,16 ± 2,78 ^{ab}	12,33 ± 3,38 ^a
	Gozd. inok.	polno	3,33 ± 1,23 ^a	7,50 ± 1,56 ^a	12,83 ± 3,09 ^a	17,58 ± 8,02 ^a	12,25 ± 11,22 ^a	15,58 ± 6,25 ^{ab}
	Gozd. inok.	polovično	2,83 ± 0,75 ^a	7,33 ± 1,03 ^a	11,16 ± 1,60 ^a	16,33 ± 3,83 ^a	19,16 ± 3,92 ^{ab}	18,16 ± 2,48 ^{ab}
	inokulum	gnojene	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
	Rhodovit [®]	polno	46,91 ± 12,09 ^a	46,50 ± 9,00 ^b	43,50 ± 10,61 ^b	48,41 ± 11,50 ^b	50,25 ± 11,00 ^c	50,91 ± 10,98 ^b
	Rhodovit [®]	polovično	35,16 ± 8,42 ^a	36,00 ± 4,93 ^{ab}	25,33 ± 4,32 ^a	39,50 ± 8,45 ^{ab}	41,83 ± 5,88 ^{bc}	42,33 ± 5,28 ^{ab}
	Brez inok.	polno	41,83 ± 7,44 ^a	34,50 ± 8,87 ^a	35,66 ± 10,14 ^{ab}	37,58 ± 7,57 ^{ab}	43,58 ± 7,38 ^{ac}	44,50 ± 7,32 ^b
	Brez inok.	polovično	34,00 ± 5,09 ^a	28,00 ± 4,33 ^a	34,16 ± 3,86 ^{ab}	32,50 ± 7,20 ^a	31,33 ± 3,20 ^{ab}	30,50 ± 4,13 ^a
	Gozd. inok.	polno	40,16 ± 14,28 ^a	28,41 ± 10,98 ^a	39,83 ± 12,29 ^a	32,83 ± 13,53 ^a	31,75 ± 11,75 ^b	32,25 ± 11,92 ^a
	Gozd. inok.	polovično	46,00 ± 8,02 ^a	35,16 ± 5,67 ^{ab}	35,66 ± 7,55 ^{ab}	42,66 ± 9,97 ^{ab}	38,83 ± 4,44 ^{bc}	38,83 ± 4,62 ^{ab}

4.2.2 Primerjave povprečnih vrednosti za dolžino poganjkov po datumih vzorčenja

Spremenljivko uporaba fitofarmacevtskih sredstev, smo izločili iz statistične analize (večsmerna ANOVA), ker ni imela statistično značilnega vpliva na število poganjkov. Za nadaljnje analize smo uporabili samo spremenljivki gnojenje in inokulum.

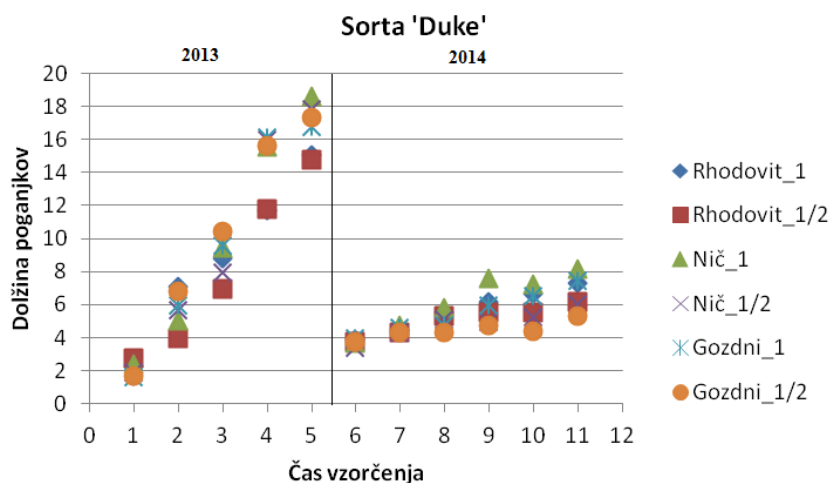
Pri sorti 'Darrow' so bile že od začetka raste sezone 2013 in 2014 izmerjene statistično značilne razlike v dolžini poganjkov med obravnavanji, medtem ko jih proti koncu obeh sezon ni bilo več. Pri sorti 'Duke' smo statistično značilne razlike v dolžini poganjkov med obravnavanji, izmerili 10. 7. 2013 in 10. 8. 2013. Drugo rastno sezono so bile izmerjene statistično značilne razlike skoraj med vsemi obravnavanji, največje pa so bile od 25. 6. 2014 naprej (med obravnavanji Rhodovit®-polno gnojen in obravnavanje gozdni inokulum-polovično gnojen). Pri sorti 'Elliott' smo največje statistično značilne razlike v dolžini poganjkov izmerili 10. 5. 2013 in 10. 6. 2013 (med obravnavanjem Rhodovit®-polno gnojen in gozdni inokulum-polno ter polovično gnojen). Od 10. 9. 2013 pa do 25. 6. 2014 smo izmerili manjše statistično značilne razlike med obravnavanji, na koncu pa razlik v dolžini poganjkov med obravnavanji ni bilo več. Iz podatkov v tabeli 9 in slikah 11, 12 in 13 je tudi razvidno, da so poganjki iz sezone 2014 pri vseh treh sortah krajši kot v pretekli sezoni.



Legenda: 1 – polni odmerek gnojila, 1/2 – polovični odmerek gnojila, Rhodovit, Gozdni – vrsta inokuluma, Nič – brez inokuluma.

Slika 11: Slika prikazuje dolžine poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Darrow'. Na x-osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y-osi so prikazane dolžine poganjkov.

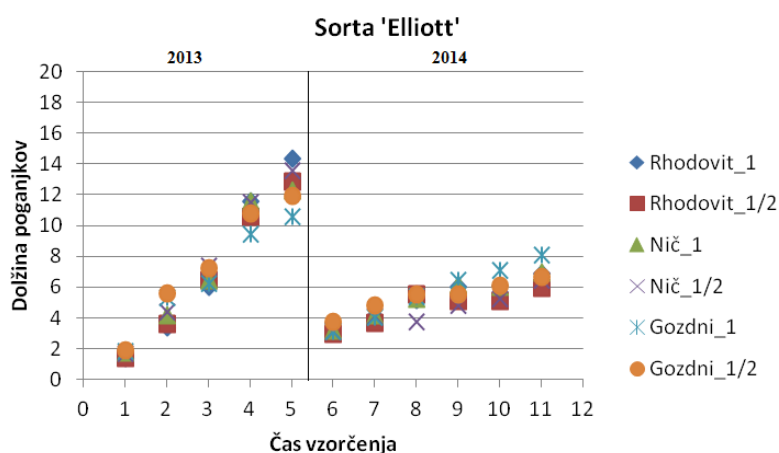
Figure 11: The figure shows the average length of shoots for individual treatment for cultivar 'Darrow'. The x-axis shows the consecutive sampling (26. apr. 2013, 10. may. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. aug. 2013, 10. sep. 2013, 22. may. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. aug. 2014, 20. sep. 2014), the y-axis shows the length of the shoots.



Legenda: 1 – polni odmerek gnojila, 1/2 – polovični odmerek gnojila, Rhodovit, Gozdni – vrsta inokuluma, Nič – brez inokuluma.

Slika 12: Slika prikazuje dolžine poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Duke'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi so prikazane dolžine poganjkov.

Figure 12: The figure shows the length of shoots for individual treatment for cultivar 'Duke'. The x-axis shows the consecutive sampling (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), the y-axis shows the length of the shoots.



Legenda: 1 – polni odmerek gnojila, 1/2 – polovični odmerek gnojila, Rhodovit, Gozdni – vrsta inokuluma, Nič – brez inokuluma.

Slika 13: Slika prikazuje dolžine poganjkov za posamezna obravnavanja za sorto 'Elliott'. Na x osi so prikazana zaporedna vzorčenja (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), na y osi so prikazane dolžine poganjkov.

Figure 13 The figure shows the length of shoots for individual treatment for cultivar 'Elliott'. The x-axis shows the consecutive sampling (26. apr. 2013, 10. maj. 2013, 10. jun. 2013, 10. jul. 2013, 10. avg. 2013, 10. sep. 2013, 22. maj. 2014, 25. jun. 2014, 30. jul. 2014, 25. avg. 2014, 20. sep. 2014), the y-axis shows the length of the shoots.

Preglednica 9: Podatki o dolžini poganjkov za posamezno obravnavanje (Rhodovit[®], brez inokuluma in gozdni inokulum). Prikazani so podatki o gnojenju, o sortah in datum vzorčenja. Podane vrednosti so povprečja $\pm$ standardni odklon in število meritev (n). Povprečne vrednosti v istem stolpcu brez enake skupne črkovne oznake (a, b, c) so med seboj statistično različne ($P < 0,05$; test mnogoterih primerjav Tukeyevi kontrasti).

Table 9: Data of the length of shoots per treatment (Rhodovit[®] without inoculum and forest inoculum). Data of fertilizer treatment, cultivars and date of sampling. Note that the values are the mean values $\pm$ standard deviation. Means within a row without common superscript letter (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey's contrasts.

Povprečne dolžine poganjkov ($\pm$ SD)								
'Darrow'	inokulum	gnojene	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
	Rhodovit [®]	polno	2,27 $\pm$ 1,578 ^a n=55	7,07 $\pm$ 4,65 ^{ab} n=94	8,82 $\pm$ 7,46 ^a n=174	11,71 $\pm$ 8,50 ^a n=292	15,06 $\pm$ 10,50 ^a n=276	
	Rhodovit [®]	polovično	2,07 $\pm$ 1,16 ^a n=33	6,27 $\pm$ 4,20 ^a n=67	7,99 $\pm$ 6,83 ^a n=107	11,53 $\pm$ 8,20 ^a n=124	13,50 $\pm$ 8,82 ^a n=116	
	Brez inok.	polno	3,20 $\pm$ 1,90 ^b n=66	7,68 $\pm$ 5,44 ^{ab} n=109	9,29 $\pm$ 7,54 ^a n=224	14,67 $\pm$ 10,59 ^b n=252	16,42 $\pm$ 12,05 ^a n=235	
	Brez inok.	polovično	2,24 $\pm$ 1,13 ^{ab} n=34	6,74 $\pm$ 5,88 ^{ab} n=52	9,02 $\pm$ 8,42 ^a n=82	12,46 $\pm$ 8,72 ^{ab} n=99	14,62 $\pm$ 10,53 ^a n=91	
	Gozd. inok.	polno	2,23 $\pm$ 1,59 ^a n=77	9,04 $\pm$ 6,72 ^b n=99	9,65 $\pm$ 7,08 ^a n=196	13,27 $\pm$ 8,40 ^{ab} n=208	14,59 $\pm$ 9,39 ^a n=240	
	Gozd. inok.	polovično	3,37 $\pm$ 1,72 ^b n=26	9,85 $\pm$ 7,27 ^b n=49	10,22 $\pm$ 7,97 ^a n=90	14,00 $\pm$ 9,80 ^{ab} n=104	15,56 $\pm$ 11,63 ^a n=99	
	inokulum	gnojene	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
	Rhodovit [®]	polno	3,89 $\pm$ 3,12 ^b n=487	4,43 $\pm$ 4,44 ^b n=530	5,51 $\pm$ 6,64 ^a n=457	6,17 $\pm$ 9,74 ^a n=573	6,64 $\pm$ 10,87 ^b n=555	7,32 $\pm$ 10,93 ^a n=562
	Rhodovit [®]	polovično	3,29 $\pm$ 2,43 ^{ab} n=159	3,39 $\pm$ 3,05 ^a n=174	5,23 $\pm$ 5,70 ^a n=152	5,83 $\pm$ 9,35 ^a n=202	5,90 $\pm$ 9,78 ^{ab} n=209	6,67 $\pm$ 9,95 ^a n=208
	Brez inok.	polno	3,36 $\pm$ 2,72 ^a n=550	4,28 $\pm$ 3,35 ^{ab} n=432	5,18 $\pm$ 5,02 ^a n=494	5,94 $\pm$ 8,29 ^a n=535	6,12 $\pm$ 10,11 ^{ab} n=572	7,04 $\pm$ 10,30 ^a n=574
	Brez inok.	polovično	3,24 $\pm$ 3,11 ^a n=225	4,09 $\pm$ 4,17 ^{ab} n=184	4,20 $\pm$ 4,69 ^a n=200	4,26 $\pm$ 5,35 ^a n=202	4,22 $\pm$ 5,99 ^a n=218	5,30 $\pm$ 6,48 ^a n=216
	Gozd. inok.	polno	3,49 $\pm$ 2,82 ^{ab} n=547	4,04 $\pm$ 3,67 ^{ab} n=451	5,25 $\pm$ 6,18 ^a n=459	6,05 $\pm$ 9,25 ^a n=514	6,47 $\pm$ 10,43 ^{ab} n=507	7,27 $\pm$ 10,64 ^a n=508
	Gozd. inok.	polovično	3,25 $\pm$ 2,44 ^a n=256	3,55 $\pm$ 2,84 ^a n=216	4,92 $\pm$ 5,38 ^a n=207	5,06 $\pm$ 7,28 ^a n=231	5,25 $\pm$ 8,68 ^{ab} n=223	6,03 $\pm$ 8,85 ^a n=222
'Duke'	inokulum	gnojene	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
	Rhodovit [®]	polno	2,33 $\pm$ 1,09 ^a n=21	4,20 $\pm$ 3,47 ^a n=49	6,97 $\pm$ 6,04 ^a n=116	11,49 $\pm$ 8,84 ^a n=153	15,81 $\pm$ 11,67 ^a n=168	
	Rhodovit [®]	polovično	2,74 $\pm$ 1,80 ^a n=12	3,99 $\pm$ 3,27 ^a n=36	6,96 $\pm$ 5,29 ^{ab} n=54	11,75 $\pm$ 8,94 ^{ab} n=96	14,78 $\pm$ 10,58 ^a n=97	
	Brez inok.	polno	2,37 $\pm$ 1,54 ^a n=30	5,01 $\pm$ 4,15 ^a n=67	9,44 $\pm$ 7,14 ^{ab} n=118	15,53 $\pm$ 10,94 ^{bc} n=141	18,62 $\pm$ 12,40 ^a n=126	
	Brez inok.	polovično	1,87 $\pm$ 1,04 ^a n=24	5,64 $\pm$ 4,18 ^a n=39	7,96 $\pm$ 6,33 ^{ab} n=64	15,97 $\pm$ 9,11 ^{bc} n=68	17,79 $\pm$ 10,92 ^a n=67	

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Podatki o dolžini poganjkov za posamezno obravnavanje (Rhodovit[®], brez inokuluma in gozdni inokulum

Povprečne dolžine poganjkov (± SD)								
'Duke'	inokulum	gnojene	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
	Gozd. inok.	polno	1,64 ± 1,13 ^a n=28	5,95 ± 4,64 ^a n=60	9,59 ± 7,22 ^b n=102	16,10 ± 11,26 ^c n=137	16,73 ± 11,68 ^a n=153	
	Gozd. inok.	polovično	1,68 ± 0,93 ^a n=15	6,78 ± 5,70 ^a n=25	10,41 ± 7,94 ^b n=48	15,64 ± 11,22 ^a n=60	17,33 ± 11,88 ^a n=59	
	inokulum	gnojene	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
	Rhodovit [®]	polno	4,17 ± 2,79 ^b n=397	5,10 ± 4,51 ^a n=407	6,16 ± 5,72 ^b n=363	7,60 ± 9,44 ^b n=410	7,92 ± 11,23 ^c n=417	8,48 ± 11,46 ^b n=424
	Rhodovit [®]	polovično	3,76 ± 2,76 ^{ab} n=129	4,28 ± 3,67 ^a n=137	5,31 ± 5,60 ^{ab} n=117	5,49 ± 7,80 ^{ab} n=143	5,49 ± 8,23 ^{ac} n=153	6,16 ± 8,32 ^{ab} n=159
	Brez inok.	polno	3,66 ± 3,26 ^{ab} n=393	4,77 ± 4,13 ^a n=317	5,84 ± 6,36 ^{ab} n=342	7,55 ± 10,63 ^b n=357	7,24 ± 11,35 ^{bc} n=400	8,18 ± 11,50 ^b n=400
	Brez inok.	polovično	3,36 ± 3,00 ^a n=206	4,34 ± 3,80 ^a n=149	5,08 ± 10,55 ^{ab} n=178	4,96 ± 6,08 ^a n=183	5,22 ± 7,92 ^{ab} n=193	6,02 ± 8,03 ^{ab} n=198
	Gozd. inok.	polno	3,93 ± 3,14 ^{ab} n=428	4,57 ± 3,81 ^a n=348	4,76 ± 4,62 ^a n=374	5,94 ± 8,59 ^{ab} n=420	6,55 ± 10,18 ^{ac} n=394	7,44 ± 10,28 ^{ab} n=398
	Gozd. inok.	polovično	3,73 ± 3,24 ^{ab} n=189	4,28 ± 3,72 ^a n=176	4,34 ± 4,09 ^a n=161	4,76 ± 7,02 ^a n=184	4,39 ± 4,90 ^a n=183	5,34 ± 5,08 ^a n=184
'Elliott'	inokulum	gnojene	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
	Rhodovit [®]	polno	1,39 ± 0,61 ^a n=69	3,40 ± 2,26 ^a n=141	6,01 ± 4,76 ^a n=229	11,56 ± 7,90 ^a n=265	14,33 ± 10,18 ^b n=247	
	Rhodovit [®]	polovično	1,40 ± 0,46 ^{ab} n=40	3,58 ± 1,97 ^a n=74	6,43 ± 4,59 ^a n=105	10,56 ± 7,28 ^a n=125	12,87 ± 8,79 ^{ab} n=124	
	Brez inok.	polno	1,75 ± 0,69 ^{bc} n=78	4,20 ± 2,90 ^a n=155	6,46 ± 5,02 ^a n=208	11,60 ± 8,42 ^a n=161	12,25 ± 9,29 ^{ab} n=192	
	Brez inok.	polovično	1,65 ± 0,63 ^a n=41	4,39 ± 3,04 ^{ab} n=62	7,40 ± 6,49 ^a n=72	11,51 ± 7,56 ^a n=79	13,59 ± 9,48 ^{ab} n=74	
	Gozd. inok.	polno	1,79 ± 0,92 ^{bc} n=89	5,34 ± 4,21 ^b n=155	6,26 ± 4,53 ^a n=223	9,40 ± 7,20 ^a n=147	10,59 ± 7,56 ^a n=187	
	Gozd. Inok.	polovično	1,88 ± 0,98 ^c n=44	5,58 ± 3,81 ^b n=67	7,20 ± 6,76 ^a n=98	10,80 ± 7,73 ^a n=115	11,94 ± 8,28 ^{ab} n=109	
	inokulum	gnojene	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
	Rhodovit [®]	polno	3,68 ± 2,52 ^b n=530	4,09 ± 3,49 ^{ab} n=558	5,19 ± 4,76 ^b n=522	6,03 ± 7,34 ^a n=581	6,11 ± 8,94 ^a n=603	6,86 ± 9,06 ^a n=611
	Rhodovit [®]	polovično	2,98 ± 1,86 ^a n=211	3,70 ± 3,19 ^a n=216	5,52 ± 5,03 ^b n=152	5,11 ± 6,35 ^a n=236	5,08 ± 7,90 ^a n=251	5,95 ± 7,93 ^a n=254
	Brez inok.	polno	3,20 ± 2,66 ^{ac} n=502	4,19 ± 3,71 ^{ab} n=414	5,24 ± 5,52 ^b n=428	6,16 ± 8,39 ^a n=451	6,00 ± 9,17 ^a n=523	6,94 ± 9,29 ^a n=534
	Brez inok.	polovično	3,10 ± 2,70 ^{ab} n=203	4,11 ± 3,74 ^{ab} n=168	3,71 ± 3,81 ^a n=205	4,83 ± 6,57 ^a n=195	5,26 ± 7,90 ^a n=188	6,43 ± 8,11 ^a n=183
	Gozd. inok.	polno	3,12 ± 2,72 ^a n=482	4,05 ± 3,83 ^{ab} n=341	5,40 ± 4,04 ^b n=357	6,45 ± 9,21 ^a n=394	7,12 ± 11,17 ^a n=381	8,05 ± 11,38 ^a n=387
	Gozd. inok.	polovično	3,75 ± 2,96 ^{bc} n=276	4,83 ± 4,07 ^b n=211	5,5 ± 4,95 ^b n=214	5,50 ± 7,25 ^a n=256	6,09 ± 8,29 ^a n=233	6,68 ± 8,24 ^a n=233

4.2.3 Vpliv fitofarmacevtskih sredstev, tipa inokuluma in tipa gnojenja na število poganjkov

Spremenljivko uporaba fitofarmacevtskih sredstev, smo izločili iz statistične analize (večsmerna ANOVA), ker ni imela statistično značilnega vpliva na število poganjkov. Za nadaljnje analize smo uporabili samo spremenljivki gnojenje in inokulum.

Pri sorti 'Darrow' na začetku meritev (2013) ne tip inokuluma ne metoda gnojenja nista imela statistično značilnega vpliva na število poganjkov, medtem ko je v drugi rastni sezoni (2014) na število poganjkov statistično značilno vplivalo gnojenje. Pri sorti 'Duke' je bil v letu 2013 opažen statistično značilen vpliv inokuluma na število poganjkov na koncu rastne sezone. Na število poganjkov je v naslednji rastni sezoni vplivalo gnojenje. Pri sorti 'Elliott' so bili rezultati ravno obratni. Proti koncu rastne sezone 2013 je imel inokulum statistično značilen vpliv na število poganjkov in prav tako v naslednji rastni sezoni (2014) (preglednica 10, glej tudi slike 8, 9, 10 - grafi zgoraj).

Preglednica 10: Podane so *P* vrednosti ('***' $P < 0,001$, '**' $P < 0,01$, '*' $P < 0,05$) za vpliv gnojenja in vpliv inokuluma na število poganjkov po datumih vzorčenja za posamezno sorto (večsmerna ANOVA). V primeru, da ni oznake, pomeni to, da statistično značilnih razlik med obravnavanji ni.

Table 10: There are the *P* values ('***' $P < 0,001$, '**' $P < 0,01$, '*' $P < 0,05$) for the effect of fertilization and the effect of inoculum on the number of shoots by the date of sampling of each cultivar (multidirectional ANOVA). In the case that there is no mark, it means that there is no statistically significant difference between treatments.

Termin meritev						
'Darrow'	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
inokulum						
gnojene						
'Darrow'	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
inokulum	*					
gnojene	**	***	**	***	**	***
'Duke'	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
inokulum						*
gnojene						
'Duke'	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
inokulum						
gnojene	*	*	*	*		
'Elliott'	25. 4. 2013	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013
inokulum					**	**
gnojene						
'Elliott'	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
inokulum		***		*	***	***
gnojene						*

4.2.4 Vpliv fitofarmacevtskih sredstev, gnojenja in inokuluma na dolžino poganjkov

Spremenljivko uporaba fitofarmacevtskih sredstev smo izločili iz statistične analize (večsmerna ANOVA), ker ni imela statistično značilnega vpliva na število poganjkov. Za nadaljnje analize smo uporabili samo spremenljivki gnojenje in inokulum.

Na začetku rastne sezone je na dolžino poganjkov sorte 'Darrow' statistično značilno vplival dodatek inokuluma, medtem ko se je drugo rastno sezono pokazal stat značilno večji vpliv gnojenja. Pri sorti 'Duke' je bila situacija podobna, vendar se je v drugi rastni sezoni (2014) pojavilo menjavanje med statistično značilnim vplivom inokuluma in gnojenja. Pri sorti 'Elliott' je v začetku in na koncu rastne sezone 2013 statistično značilen vplival inokulum, vmes gnojenje. V drugi rastni sezoni 25. 6. 2014 je na dolžino poganjkov statistično značilno vplival inokulum nato pa gnojenje (preglednica 11, glej tudi slike 11, 12, 13 - grafi zgoraj).

Preglednica 11: Podane so *P* vrednosti ('***' $P < 0,001$, '**' $P < 0,01$, '*' $P < 0,05$) za vpliv gnojenja in vpliv inokuluma na dolžino poganjkov po datumih vzorčenja za posamezno sorto (večsmerna ANOVA). V primeru da ni oznake, statistično značilnih razlik med obravnavanji ni.

Table 11: There are the *P* values ('***' $P < 0,001$, '**' $P < 0,01$, '*' $P < 0,05$) for the effect of fertilization and the effect of inoculum on the lenght of shoots by the date of sampling of each cultivar (multidirectional ANOVA). In the case that there is no mark, it means that there is no statistically significant difference between treatments.

Termin meritev						
'Darrow'						
	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
inokulum	*	***		***	***	
gnojene						
'Darrow'						
	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
inokulum	*					
gnojene	*	**		*	**	**
'Duke'						
	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
inokulum	*	**	***	***	*	
gnojene						
'Duke'						
	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
inokulum	*		**	*	***	
gnojene		*		***		***
'Elliott'						
	10. 5. 2013	10. 6. 2013	10. 7. 2013	10. 8. 2013	10. 9. 2013	
inokulum	***	***			***	
gnojene			*			
'Elliott'						
	26. 4. 2014	22. 5. 2014	25. 6. 2014	30. 7. 2014	25. 8. 2014	20. 9. 2014
inokulum			*			
gnojene				**	*	*

5 RAZPRAVA

5.1 SESTAVA ZDRUŽB ERIKOIDNIH MIKORIZNIH GLIV V KORENINAH AMERIŠKE BOROVNICE NASADIH NA LJUBLJANSKEM BARJU

V nasadih ameriške borovnice na Ljubljanskem barju smo spremljali sestavo združb endofitskih gliv v koreninah te rastline z uporabo pomnoževanja (PCR) genskih markerjev ribosomalne regije ITS, izdelavo klonskih knjižnic in sekvenciranja po Sangerju. Preučevali smo razlike v sestavi združb endofitskih gliv glede na starost nasada (18 in 30 let) in čas vzorčenja. Tla v nasadih so bogata s hranili, vendar so zaradi slabe mineralizacije hranila težko dostopna, ker je v tleh veliko nemineralizirane organske snovi (šote). Zato imajo tukaj pomembno vlogo tako mikorizne kot tudi saprofitske glive, ki odmrle dele rastlin spreminjajo v borovnici dostopno obliko. Na obeh lokacijah (18 in 30 let star nasad) so se pojavili taksoni gliv, ki se preživljajo s saprofitskim načinom življenja, torej živijo na odmrlem organskem tkivu. Vsi taksoni gliv, ki smo jih potrdili v tej študiji spadajo v deblo gliv Basidiomycota. Tipično erikoidne mikorizne glive uvrščamo v deblo Ascomycota, čeprav so nedavne raziskave erikoidnih mikoriznih gliv iz južne Afrike potrdile, da se v koreninah pri različnih vrstah res (rod *Erica*) najdejo tudi endofitske glive iz debela Basidiomycota (Bizabani in Dames, 2015a). Združbe gliv v/nasadih koreninah ameriške borovnice so bile različne v različno starih nasadih (18 in 30 let). To smo sicer lahko potrdili le za jesensko vzorčenje leta 2013, ker iz vzorcev korenin vzorčenih v letu 2014 nismo uspeli pridobiti zadostnega števila uporabnih sekvenc za izvedbo statističnih analiz. Eden od možnih razlogov je tudi ta, da so bili pred vzorčenjem spomladi in poleti 2014 na območju nasadov uporabljeni fungicidi, kar bi lahko vplivalo na prisotnost gliv na tem območju, medtem ko v času jesenskega vzorčenja leta 2013 škropljenja s fungicidi ni bilo ca 9 mesecev. To je tudi možen razlog, da smo največjo diverziteto gliv potrdili v vzorcih iz jesenskega vzorčenja (oktober 2013). Ti vzorci so se ločili na dve skupini, ki sta si med seboj po sestavi združb različni med različno starimi nasadi (slika 8), kar smo potrdili tudi s statističnimi metodami ($p = 0,04953$, Kruskal-Wallisov test).

Ugotovili smo, da so se glive iz družine Mycenaceae v večjem številu pojavljale predvsem v starejšem nasadu (30-let), tako jeseni 2013, kot spomladi 2014, medtem ko smo v 18-letnem nasadu zasledili le nekaj sekvenc iz te družine gliv (slika 7, preglednica 6). Glivo *Mycena galopus* smo v mlajšem nasadu zasledili z eno samo sekvenco medtem, ko je bila v starejšem nasadu bolj abundantna predvsem jeseni 2013 (skupno 10 sekvenc). Vrsto *Mycena vitilis* smo potrdili izključno v starejšem nasadu v času jesenskega vzorčenja leta 2013 z relativno veliko abundanco (19 sekvenc). Poleg glive *Mycena galopus* smo v mlajšem nasadu odkrili tudi glivo *Mycena algeriensis*, vendar je bila potrjena z eno samo sekvenco. Gliva *Mycena algeriensis* na tem področju še ni bila najdena po podatkih iz *Boletus informaticus*, ki beleži in kartira pojavnost gob v

Sloveniji. Zato ni čisto gotovo ali je res pravo ime. Ostali dve vrsti sta bili pa najdeni tudi na obočju Ljubljanskega barja. (Ogris, 2004) Za glive iz te družine je značilno, da ne tvorijo mikorize, ampak razgrajujejo odmrle ostanke listja, korenin in vej (organsko snov). Možno je, da so bile prisotne v odmrlih koreninah, ki jih je zaradi specifične strukture lasastih korenin pri borovnici težko ločiti od vitalnih korenin. To bi lahko bil tudi razlog, da smo največjo abundanco teh gliv znotraj nasada potrdili v času jesenskega vzorčenja, torej konec rastne sezone. Prav tako je možno, da je v starejših nasadih s 30-let starimi grmi več odmrle koreninske biomase kot pri bolj mladih rastlinah in zato predstavljajo bolj ugoden habitat za tak tip gliv. Glive te skupine tvorijo tudi trosnjake (gobe), ki so zelo majhni, redko večji od nekaj cm, pogosteje le z nekaj mm premera. Zelo hitro jih spregledamo, ker večinoma rastejo posamezno, včasih pa jih najdemo v skupinah. Zanje je značilno stožčasto do ovalno trosišče na dolgem, tankem stebelcu. Ponavadi so sive, rjave ali belkaste (Kuo, 2010). Študije o teh glivah so razkrile, da se pojavljajo v različnih gozdnih habitatih, predvsem iglastih habitatih, kjer so tla revna s hranili in vlažna ter da se ponekod pojavijo tudi skupaj s predstavniki reda Ericales (Thormann in Rice, 2007; Vohnik in sod., 2012a; Parker, 2013). Glivo *Mycena algeriensis* so našli tudi na odmrlem lesu hrasta vrste *Quercus ilex* in *Quercus suber* (Robich, 2003).

V starejšem nasadu smo jeseni potrdili tudi glivo *Delicatula integrella* (ena sama sekvenca) iz družine Tricholomataceae za katero je značilno, da se pojavlja, tako kot glive iz rodu *Mycena*, na odmrlih drevesnih ostankih, na odmrlem listju in tudi na vlažnih močvirnatih tleh porastlih z mahovi. Tvorijo zelo majhne gobe (trosnjake), ki imajo premer do 1 cm, na kratkem stebli in so ponavadi belkasto prosojne barve. Pojavljajo se posamezno ali kot skupine (Parker in O'Reilly, 2016).

V mlajšem nasadu smo poleg zgoraj navedenih taksonov potrdili še glivo *Sistotrema brinkmannii* (ena sekvenca) iz družine Hydnaceae. Zanje je značilno, da razgrajujejo zdrav les in lahko povzročajo tudi lesno gnilobo. Je talna gliva, ki se pojavlja v skoraj vsakem tipu tal in tudi v stanovanjih. Povezana je tudi z napadi borovih zalubnikov, saj sekundarno povzroča propad celih dreves (Kunkel., 2016). V Turčiji, v provinci Trabzon je na črni jelši (*Alnus glutinosa*) to glivo prvi izoliral Hallenberg (1991). Za glive iz rodu *Sistotrema* sta značilna tako saprofitski kot tudi ektomikorizni tip življenja. Bolj razširjen je saprofitski tip, kar navajajo tudi Nilsson in sod. (2006), nekateri predstavniki pa naj bi tvorili tudi ektomikorizo (Münzenberger in sod., 2012). Slednji je v svoji študiji dokazal, da sevi gliv *Sistotrema*, ki so jih nabrali na odmrlem lesu rdečega bora tvorijo tudi ektomikorizo s koreninami rdečega bora (*Pinus sylvestris*).

Na obeh lokacijah (starejši in mlajši nasad) so bile številčne tudi sekvence gliv iz reda Trechisporales. Slednje so bile najbolj zastopane sekvence na območju mlajšega nasada, kar smo za to lokacijo potrdili za vse termine vzorčenja (jeseni 2013, pomladi 2014 in

poleti 2014, glej sliko 7). Glive tega reda so poznane kot saprofiti na odmrlem lesu. V sklopu raziskav saprofitov na in v koreninah gozdne borovnice (*Vaccinium myrtillus* L.), ki je bila posajena v nasadu ter navadne brusnice (*Vaccinium vitis-idaea* L.) iz bližnjega smrekovega gozda na območju Kvithamarja (Norveška), so tudi Vohnik in sod. (2012a) izolirali glivo vrste *Trechispora alnicola* (Trechisporales). Na splošno pa o glivah iz rodu *Trechispora* ni dosti znanega, vendar naj bi bile saprofiti (Allen in sod., 2003). To dokazuje tudi raziskava Bernicchia in sod. (2007), ki so odkrili nekaj predstavnikov reda Trechisporales (*Trechispora cohaerens*, *T. farianacea*, *T. kavinioides*...), predvsem na starih odmrlih deblih in vejah iglavcev (*Pinus pinea*, *P. nigra* in *P. sylvestris*). Navedeni avtorji so te glive našli naključno in ne poznajo oz ne navajajo njihovega pomena v najdenih vzorcih.

V sklopu naših raziskav v nasadih na Ljubljanskem barju nismo potrdili prisotnosti gliv, ki se v literaturi smatrajo kot tipične erikoidne mikorizne glive (*Hymenoscyphus ericae*, *Oidiodendron maius*, *Oidiodendron griseum*, *Pezizella ericae*) in so tudi del komercialnih inokulumov, npr. Rhodovit[®] (Symbiom, CZ), ki vsebuje naslednje taksone *Oidiodendron maius*, *Hymenoscyphus ericae* sev 1 in *Hymenoscyphus ericae* sev 2. Ugotovili smo, da z novimi, kupljenimi sadikami v okolje Ljubljanskega barja ne vnašamo drugih gliv, ker te sadike praviloma niso mikorizirane z ErM glivami, kar smo potrdili tako z barvanjem in mikroskopiranjem korenin, kot tudi s tem, da iz teh korenin z uporabo molekularnih metod (PCR) nismo uspeli namnožiti glivnih markerjev. Slednje je lahko kazalec, da v koreninah sadik ni prisotnih ErM gliv, skupaj z rezultati, pridobljenimi z mikroskopijo korenin, pa lahko to trditev z veliko verjetnostjo potrdimo. Iz tega lahko sklepamo, da bi se potencialna mikorizacija korenin ameriške borovnice verjetno lahko zgodila spontano po presaditvi novih sadik v sam nasad. Kljub temu pa naši rezultati kažejo, da v različno starih nasadih ameriške borovnice na Ljubljanskem barju erikoidne mikorizne glive niso tako pogoste, kot bi pričakovali. Razlog za to bi bila lahko dolgoletna uporaba mineralnih gnojil in fitofarmacevtskih sredstev v teh nasadih, kar so potrdili tudi v študiji Powella (1982, cit. po Koron, 2008) in Gollmacka s sod. (2001), ki so tudi ugotovili, da se kolonizacija ErM zmanjša ob intenzivni uporabi mineralnih gnojil. V preteklih študijah so tudi ugotovili, da so imele korenine ameriške borovnice iz nasadov v Oregonu velik razpon koloniziranosti korenin z mikoriznimi glivami od 0,5 % do 44 % (Scagel in Yang, 2005) in da je kolonizacija korenin divje borovnice vrst *Vaccinium uliginosum* in *V. myrtillus* z ErM višja od 48 %, medtem ko je v nasadih (*V. corymbosum*) ta odstotek manjši od 6 % (Kasurinen in Holopainen, 2001). Borovnice, ki rastejo v nasadih običajno z uporabo mineralnih gnojil, prilagojenih za ta tip rastlin, dobijo lažje dostopna hranila, ki zmanjšajo potrebo rastline po vzpostavitvi simbioze z mikoriznimi glivami. Kljub temu imajo gojene *Vaccinium* vrste (visokogrmovnate, nizkogrmovnate,...) korenine pogosto kolonizirane z ErM glivami. Koloniziranost pa se zelo razlikuje glede na starost nasada, vsebnosti hranil v tleh in sorte borovnice (Scagel, 2003; Scagel in Yang, 2005; Scagel in sod., 2005a). Številni avtorji so poskušali z umetno inokulacijo borovnice z izbranimi

sevi ErM gliv (Scagel, 2005; Scagel in sod., 2005b), vendar pa to ni vedno vodilo do povečane rasti in/ali povečanja pridelka. Pozitivne rezultate z umetno inokulacijo so dosegli Vohnik in sod. (2008), ko so mineralna gnojila nadomestili z vnosom organskih gnojil. Kasnejša študija pa je pokazala, da so z vnosom organskih gnojil pospešili tudi razvoj saprofitov, ki so imeli pomembnejšo vlogo pri sproščanju hranil primernih za sprejem v korenine ameriške borovnice kot pa prave ErM glive (Vohnik in sod., 2012b). Podobno vlogo bi lahko imele tudi saprofitske glive, ki smo jih potrdili v nasadih ameriške borovnice na Ljubljanskem barju.

Poleg zgoraj naštetih razlogov, pa je možna razlaga za to, da prisotnosti erikoidnih mikoriznih gliv v naših raziskavah nismo potrdili tudi ta, da smo imeli kar nekaj težav s samo metodologijo (pomnoževanje glivnih markerjev z metodo PCR, kloniranje in sekvenciranje po Sangerju), kar je pri okoljskih vzorcih sicer dokaj običajno. V tleh, sploh takih z veliko vsebnostjo organskih snovi kot so barjanska tla, so lahko prisotni inhibitorji, ki otežijo pomnoževanje markerskih genov v reakciji PCR. Na splošno pa metodo kloniranja in sekvenciranja po Sangerju, ki smo jo uporabili v naši študiji na področju raziskav diverzitete in sestave mikrobnih združb v različnih okoljih vedno bolj izpodrivajo nove metode (visokozmogljivo sekvenciranje novih generacij, npr. Illumina), ki omogočajo procesiranje bistveno večjega števila sekvenc za vsak posamezen vzorec in raziskovanje metazdružb za tarčne organizme. Na tak način lahko karakteriziramo tudi taksone, ki so znotraj posamezne združbe manj številčni oz. redki, in ki smo jih zaradi specifičnosti uporabljenih metod v tej raziskavi lahko spregledali.

5.2 VPLIV FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV NA DIVERZITETO MIKORIZNIH GLIV

Pri spomladanskem in poletnem vzorčenju v nasadu smo na obeh lokacijah izbrali in vzorčili korenine tudi pri grmih, ki smo jih skupaj z bližnjo okolico zaščitili s PVC folijo. Predstavljali so kontrolne rastline pri uporabi fitofarmacevtskih sredstev (FFS), ker smo želeli ugotoviti, kako fungicidi Score 250 EC, Switch 62,5 WG in Signum vplivajo na mikorizo in samo diverziteto gliv v okolici korenin in na koreninah ameriške borovnice. Pri kontrolnih rastlinah smo pričakovali večje število sekvenc, vendar so bili rezultati ravno obratni (izplen je bil samo 5 sekvenc gliv iz korenin vseh kontrolnih rastlin skupaj). Na podlagi teh podatkov nismo mogli trditi, da uporaba FFS vpliva na diverziteto oz. mikorizo samo. Je pa celotno območje nasada že vrsto let večkrat (3-4x) letno tretirano s to kombinacijo fungicidov, zato ne moremo trditi, da smo s PVC zaščito dejansko izločili vpliv fungicidov na kontrolnih grmih. V študiji Filimona in sod. (2015) so ugotovili, da tretiranje tal z različnimi koncentracijami aktivne snovi difenokonazol (Score 250 EC) zmanjšuje delovanje urinaze in dehidrogenaze, kar pomeni, da negativno vpliva na aktivnost številnih talnih organizmov. Tudi Shukla (2000) je v svoji študiji testiral vpliv fungicidov na talne mikroorganizme in njihovo aktivnost v peščeno-ilovnatih tleh riževih

polj. Ugotovil je zmanjšanje populacije mikroorganizmov in zmanjšanje aktivnosti nekaterih encimatskih procesov. Kljub vsemu, je bil ta vpliv v tem konkretnem primeru kratkotrajen in se je stanje zelo hitro izboljšalo po prenehanju uporabe teh sredstev.

5.3 VPLIV UPORABE INOKULUMA IN GNOJENJA NA RAZVOJ POGANJKOV

Vpliv FFS smo spremljali tudi pri lončnem poskusu. S testom večsmerne ANOVE (tri spremenljivke: inokulum, gnojenje, FFS) smo ugotovili, da uporaba FFS, nima statistično značilnega vpliva na rast in število poganjkov ameriške borovnice, ne glede na začetno inokulacijo sadik s komercialnim ali naravnim inokulumom oz. tipom gnojenja. Zato smo za nadaljnje analize to spremenljivko v lončnem poskusu izločili.

5.3.1 Število poganjkov

Pri testu primerjave vpliva uporabe glivnega inokuluma in gnojenja na število poganjkov smo ugotovili, da pri sorti 'Darrow' na število poganjkov vpliva gnojenje, vendar se je vpliv gnojenja pojavil šele v začetku druge rastne sezone, kar je lahko zaradi slabše razvitega koreninskega sistema v prvi sezoni in večje potrebe po hranilih v drugi sezoni (večje rastline) (preglednica 10). Pri prvi meritvi v času druge rastne sezone (2014), se je poleg vpliva gnojenja pojavil tudi pozitiven vpliv inokuluma na rast rastlin. Zanimivo je, da v prvem letu ni bilo statistično značilnih razlik med obravnavanji, kasneje pa so se pojavile značilne razlike med polnimi odmerki gnojil in polovičnimi odmerki (preglednica 8, slika 8).

Pri sorti 'Duke', je situacija zelo podobna. Tu smo statistično značilen vpliv inokulacije potrdili ob zadnjih meritvah v sezoni 2013, v letu 2014 pa je na število poganjkov statistično značilno vplivalo samo gnojenje, vendar je to trajalo samo do julija 2014 in tudi med obravnavanji so bile manjše razlike predvsem med odmerki gnojenja (preglednica 8, 10, slika 9), kar lahko pripišemo temu, da je sorta dokaj zgodnja in hitreje preide v fazo mirovanja.

Zanimivo je, da je pri sorti 'Elliott' situacija popolnoma drugačna, saj je na število poganjkov že v prvem letu izrazito vplival inokulum. Vpliv smo začeli opazati proti koncu sezone 2013 in je trajal do konca 2014. Ker je 'Elliott' zelo pozna sorta je možno, da so rastline na koncu rastne sezone 2013 že vzpostavile mikorizo. Sorta 'Elliott' je bila pravzaprav edina sorta pri kateri je na število poganjkov statistično značilno vplivala uporaba inokuluma že v prvem letu (preglednica 10). Iz rezultatov pri tej sorti je tudi razvidno, da so se statistično značilne razlike med obravnavanji pojavljale v večini primerov tekom celotnega poskusa, največje razlike so vidne v drugi sezoni (Rhodovit[®] -

polno gnojen je imel največje število poganjkov v primerjavi z ostalimi) (preglednica 8, slika 10).

5.3.2 Dolžina poganjkov

Analiza dolžin poganjkov je pokazala drugačne rezultate kot analiza števila poganjkov. V vseh primerih so prvo sezono poganjki daljši kot drugo sezono, kar je verjetno posledica večjega števila poganjkov na posamezno sadiko v drugi sezoni, saj kasneje v razvoju porabi rastlina več hranil za rast novih kot za podaljševanje le teh (slike 11, 12, 13).

Tako se je npr. pri sorti 'Darrow' že na začetku sezone 2013 pokazal statistično značilen vpliv inokuluma, ki je trajal do konca sezone. V drugi sezoni (2014) se je situacija obrnila in je na dolžino poganjkov statistično značilno vplivalo gnojenje (preglednica 11). Analize so pokazale tudi to, da so bile dolžine poganjkov pri obravnavanjih, kjer smo uporabili komercialni inokulum Rhodovit® v nekaterih obdobjih meritev v letu 2013 statistično značilno manjše kot pri uporabi gozdnega inokuluma in obravnavanjih brez inokuluma, medtem ko so si bila obravnavanja v drugi sezoni bolj ali manj podobna (preglednica 9, slika 11).

Pri sorti 'Duke', smo ugotovili, da ima tekom celotnega poskusa na dolžino poganjkov značilen vpliv uporaba inokuluma, tekom sezone 2014, pa se je pojavil tudi značilen vpliv gnojenja (preglednica 11). Ugotovili smo, da imajo poganjki s komercialnim inokulumom v nekaterih terminih vzorčenja prve sezone krajše poganjke kot ostala obravnavanja, medtem ko je ta razlika v drugi sezoni malo drugačna. Na začetku so bolj izenačena obravnavanja, nato pa so opažene razlike predvsem med komercialnim inokulumom in ostalimi obravnavanji (preglednica 9, slika 12).

Pri sorti 'Elliott' je bil vpliv inokuluma na rast poganjkov značilen predvsem na začetku meritev v rastni sezoni 2013, kasneje se je ta vpliv zmanjšal. V drugi sezoni je opazen predvsem vpliv gnojenja in to zadnje tri mesece (preglednica 11). Tudi pri sorti 'Elliott' smo opazili, da so imela obravnavanja z dodatkom gozdnega inokuluma daljše poganjke, kot obravnavanja, kjer smo dodali komercialni inokulum, in sicer na začetku sezone 2013. Na začetku druge sezone so bile med obravnavanji manjše razlike, potem pa so bila obravnavanja med seboj bolj izenačena (slika 13). Ravno obratno so ugotovili Yang in sod. (1998), da so imele neinokulirane rastline sorte 'Elliott' prvo in drugo leto slabšo rast kot inokulirane. Inokulirane rastline so imele za 20 cm daljše poganjke od neinokuliranih.

Podobno študijo o vplivu inokulacije na rast različnih sort ameriške borovnice je objavila Koronova (2008), ki je inokulirala dve sorti ameriške borovnice 'Jersey' in 'Blueray', ki sta rastli na Ljubljanskem Barju, z glivama *Oidiodendron griseum* in *Oidiodendron rhodogenum*. Spremljala je skupno dolžino poganjkov od inokulacije rastlin do prehoda

rastlin v rodnost (4 leta). Rastline sorte 'Jersey' so bile prvo in drugo leto po inokulaciji z različnima tipoma inokuluma v povprečju višje kot rastline sorte 'Blueray'. Razlike med obravnavanji so se v zadnjih dveh letih zmanjševale predvsem zaradi mikorizacije vseh, tudi neinokuliranih korenin, do katere je prišlo zaradi problemov pri izolaciji rastlin v naravnem okolju zaradi spontane mikorizacije iz okolja. Če povzamemo, je bila kolonizacija korenin z mikorizno glivo boljša pri sorti 'Jersey', kot pri sorti 'Blueray'. Najbolj kolonizirane so bile borovnice inokulirane z glivo *O. rhodogenum*. Pri sorti 'Blueray' je bila najboljša kolonizacija, kjer je bil dodan MOS (mešanica šote in vermikulita) in najslabša je bila rast neinokuliranih borovnic. Tudi Carrillo in sod. (2015), je ugotovil, da se različne sorte ameriške borovnice različno odzovejo na dodan inokulum in da je sama kolonizacija odvisna od sorte in prav tako od tipa inokuluma.

6 SKLEPI

V začetku naloge smo si zastavili tri hipoteze in v povezavi z njimi na podlagi rezultatov, pridobljenih v tej nalogi, sklepamo naslednje:

H1: V koreninah rastlin ameriške borovnice iz različno starih nasadov je pestra sestava združb endofitskih gliv, ki se med različno starimi nasadi razlikuje.

- V koreninah rastlin ameriške borovnice, ki rastejo v nasadih na Ljubljanskem barju, v katerih smo vzorčili, z uporabo molekularnih metod nismo potrdili prisotnosti erikoidnih mikoriznih gliv, smo pa v oz. na površini korenin potrdili prisotnost več saprofitskih gliv, za katere mikorizna funkcija zaenkrat ni poznana. Predvidevamo, da bi lahko na pojav erikoidne mikorize negativno vplivala uporaba mineralnih gnojil, pesticidov znotraj nasada
- Tudi uporaba same molekularne metode je lahko vplivala na neidentifikacijo erikoidnih mikoriznih gliv. Težave pri pomnoževanje glivnih markerjev z metodo PCR, kloniranje in sekvenciranje po Sangerju, ki je že zastarela metoda. Bi jo morali mogoče nadomestiti z uporabo modernejše metode npr Illumina, ki procesirajo več sekvenc za posamezni vzorec. Problem so lahko tudi inhibitorji v tleh, ki otežijo pomnoževanje markerskih genov v reakciji PCR. S tako metodologijo bi verjetno dobili boljše rezultate in mogoče ne bi spregledali sekvenc erikoidnih mikoriznih gliv.
- Vsi taksoni gliv, ki smo jih potrdili v tej študiji so poznani kot saprofitske glive, ki spadajo v deblo gliv Basidiomycota, vendar se sestava združb statistično značilno razlikuje med starejšim (30 let) in mlajšim (18 let) nasadom ameriške borovnice na tem območju.
- Ugotovili smo, da so se glive iz družine Mycenaceae v večjem številu pojavljale predvsem v starejšem nasadu (30-let), tako jeseni 2013, kot spomladi 2014, medtem ko smo v 18-letnem nasadu zasledili le nekaj sekvenc iz te družine gliv. Možno je, da so bile prisotne v odmrlih koreninah, ki jih je zaradi specifične strukture lasastih korenin pri borovnici težko ločiti od vitalnih korenin, vendar ni zaslediti podrobnosti o tem problemu. To bi lahko bil tudi razlog, da smo največjo abundanco teh gliv znotraj nasada potrdili v času jesenskega vzorčenja, torej konec rastne sezone, in v starejšem nasadu rastlin (več odmrlih korenin pri starejših rastlinah).
- Na obeh lokacijah (starejši in mlajši nasad) so bile številčne tudi sekvence gliv iz reda Trechisporales. Slednje so bile najbolj zastopane na območju mlajšega

nasada, kar smo za to lokacijo potrdili za vse termine vzorčenja (jeseni 2013, pomladi 2014 in poleti 2014). Pogoste so bile tudi v starejšem nasadu, vendar izključno v času jesenskega vzorčenja.

H2: Škropljenje rastlin s pripravkoma Score 250 EC in Switch 62,5 WG negativno vpliva na diverziteto mikoriznih gliv v koreninah ameriške borovnice.

- Pri kontrolnih rastlinah (v času škropljenja nasada zaščitene s PVC folijo) smo pričakovali večje število glivnih sekvenc, vendar je bil skupen izplen samo pet sekvenc gliv iz korenin vseh kontrolnih rastlin skupaj. Vse glive so bile potrjene kot saprofiti. Na podlagi teh podatkov nismo uspeli potrditi, da uporaba FFS vpliva na diverziteto oz. mikorizo. Celotno območje nasada je že vrsto let redno tretirano s fungicidi, zato ne moremo trditi, da smo s PVC zaščito dejansko izločili vpliv fungicidov na kontrolnih grmih.
- Največ glivnih sekvenc smo namnožili iz korenin, vzorčenih ob jesenskem vzorčenju leta 2013, ko je bil največji časovni razmik med samim škropljenjem in časom vzorčenja korenin. To bi lahko bil pokazatelj, da škropljenje s fungicidi na splošno negativno vpliva na pojav gliv v tleh na tem območju. Smo pa z lončnim poskusom vpliv FFS izločili, tako da bi bilo potrebno temu sklepu posvetiti več časa, da bi bolje razumeli vpliv.

H3: Kupljene sadike ameriške borovnice ob nakupu niso mikorizirane, zato se bolje razvijajo, če jih okužimo z inokulumom, ki vsebuje propagule erikoidnih mikoriznih gliv. Na razvoj sadik pa vplivata tudi gnojenje in uporaba fitofarmacevtskih sredstev.

- Nemikoriziranost kupljenih sadik smo potrdili tako z barvanjem in mikroskopijo (korenine niso bile kolonizirane z glivami), kot z molekularnimi metodami (glivnih markerjev z metodo PCR nismo uspeli namnožiti, kar kaže, da gliv v koreninah ni oz. so zelo maloštevilne).
- Kupljene sadike (vsaj serija rastlin, ki je bila predmet te raziskave) ne predstavljajo potencialnega vira tujerodnih gliv za zavarovano območje Ljubljansko barje.
- V našem primeru smo z lončnim poskusom, hipotezo o negativnih vplivih fitofarmacevtskih sredstev na diverziteto gliv zavrnili. Pri sadikah z inokulumom, in pri tistih brez, vpliv škropljenja ni statistično vplival niti na dolžino, niti na število poganjkov sadik ameriške borovnice, pri treh obravnavanih sortah ('Darrow', 'Duke', 'Elliott').

- Različne sorte ameriške borovnice se različno odzovejo na dodatek inokuluma. Odmerki gnojila sortno specifično vplivajo na število in dolžino poganjkov. Tudi večje število poganjkov na rastlino lahko vpliva na posledično krajše poganjke in obratno. Odziv je odvisen tudi od časa meritev oz. faze rasti rastline, zato bi bilo tovrstne meritve potrebno izvajati in vrednotiti za različne sorte skozi daljša časovna obdobja.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Nasadi visokogrmovnate ameriške borovnice (*Vaccinium corymbosum* L.), se hitro širijo po območju naravnega rezervata Ljubljansko barje, ki so ga že od nekdaj uporabljali v kmetijske namene. Z izsuševanjem in kmetijsko uporabo se je skozi leta tanjšala kislota plast in posledično se je dvigoval nivo podtalnice in ravno te razmere, vključno s primernim podnebjem, so idealne za pridelavo ameriške borovnice. Na to nakazuje tudi dejstvo, da se površine nasadov ameriške borovnice iz leta v leto povečujejo (leta 2012 po podatkih statističnega urada že 27,1 ha oz 58.529 sadik). Kljub temu, da je območje zavarovano in od leta 2004 v območju Natura 2000, za katera veljajo strogi predpisi in pravila o varovanju narave in vnosu tujerodnih vrst, ni podatkov o diverziteti in sezonski dinamiki erikoidnih mikoriznih gliv oz. njihovem potencialnem vnosu na območje s sajenjem kupljenih sadik ameriške borovnice. Slednje so sicer najpogostejše zastopane z vrstami, kot so *Hymenoscyphus ericae*, *Oidiodendron maius*, *Oidiodendron griseum*, *Pezizella ericae*, ki se največkrat pojavljajo z vresovkami v naravnem okolju in nasadih po vsem svetu. Poleg tega je zelo malo dostopnih podatkov o tem, kako različni agrotehnični ukrepi, kot npr. uporaba fungicidov, vplivajo na erikoidno mikorizo na koreninah ameriške borovnice. Za borovnico so te glive zelo pomembne, saj same težje pridejo do primernih hranil za njeno rast in razvoj, ker ima slabše razvite koreninski sistem.

V nalogi smo z namenom karakterizacije združb gliv v/na vzorčili korenine ameriške borovnice uvoženih sadik in v dveh nasadih, starih 18 in 30 let. V slednjih smo vzorčili v oktobru 2013, ter v aprilu in juniju 2014, da bi preučili sezonsko dinamiko sestave združb erikoidnih mikoriznih gliv. Preparate iz presvetljenih in obarvanih delčkov korenin ameriške borovnice smo pregledali pod mikroskopom, da smo ocenili mikorizno kolonizacijo in iz njih ekstrahirali DNK, ter uporabili nabor molekularnih metod za karakterizacijo mikoriznih združb, ki so v grobem zajemale verižno reakcijo s polimerazo (PCR) z uporabo začetnih oligonukleotidov ITS1F in ITS4R in pripravo klonskih knjižnic rRNA.

Naši rezultati niso potrdili prisotnosti erikoidnih mikoriznih gliv v nasadih ameriške borovnice na Ljubljanskem barju ampak samo saprofitske glive iz debla Basidiomycota. Prav tako nismo potrdili koloniziranosti kupljenih sadik ameriške borovnice z mikoriznimi glivami. Največja diverziteta gliv je bila potrjena v času jesenskega vzorčenja (oktober 2013), z različno sestavo glivnih združb med različno starima nasadoma. Ugotovili smo, da so se glive iz družine Mycenaceae v večjem številu pojavljale predvsem v starejšem nasadu (30-let), tako jeseni 2013, kot spomladi 2014, medtem ko smo v 18-letnem nasadu zasledili le nekaj sekvenc iz te družine gliv. Na obeh lokacijah (starejši in mlajši nasad) so bile številčne tudi sekvence gliv iz reda

Trechisporales. Slednje so bile najbolj zastopane na območju mlajšega nasada, kar smo za to lokacijo potrdili za vse termine vzorčenja (jeseni 2013, pomladi 2014 in poleti 2014). Pogoste so bile tudi v starejšem nasadu, vendar izključno v času jesenskega vzorčenja. Pri kontrolnih rastlinah (v času škropljenja nasada zaščitene s PVC folijo) smo pričakovali večje število glivnih sekvenc, vendar je bil skupen izplen samo pet sekvenc gliv iz korenin vseh kontrolnih rastlin skupaj.

Razlog za to, da mikoriznih gliv znotraj raziskovanih nasadov nismo uspeli identificirati, bi lahko bila dolgoletna uporaba mineralnih gnojil in fitofarmacevtskih sredstev, kar so potrdili tudi nekateri tuji avtorji v svojih študijah, ko so ugotovili, da je v intenzivnih nasadih ameriške borovnice (*V. corymbosum*), kolonizacija zelo nizka (tudi pod 6 %), medtem, ko je v naravnih rastiščih gozdne borovnice (*Vaccinium uliginosum* in *V. myrtilus*), lahko nad 40 % (Kasurinen in Holopainen, 2001). Smo pa potrdili prisotnost več vrst saprofitskih gliv, ki z razgradnjo odmrlih ostankov rastlin verjetno povečajo dostopnost mineralnih hranil rastlinam. Te glive so pripadale vrstam *Mycena galopus*, *Mycena vitilis*, *Mycena algeriensis*, *Delicatula integrella*, *Sistotrema brinkmannii* in predstavnikom reda Trechisporales. Vse glive spadajo med saprofite in nekatere tvorijo tudi trosnjake, in se tudi po omembah starejših študij lahko pojavljajo na koreninah oz. ob koreninah različnih vresovk, med drugim tudi na ameriški borovnici in v vlažnih, kislih habitatih, kot npr. šotna barja, iglasti gozdovi, itd. Poleg zgoraj naštetih razlogov, pa je možna razlaga za to, da prisotnosti erikoidnih mikoriznih gliv v naših raziskavah nismo potrdili tudi ta, da smo imeli kar nekaj težav s samo metodologijo. V tleh, sploh takih z veliko vsebnostjo organskih snovi, kot so barjanska tla, so lahko prisotni inhibitorji, ki otežijo pomnoževanje markerskih genov v reakciji PCR. Na splošno pa metodo kloniranja in sekvenciranja po Sangerju, izpodrivajo nove metode (npr. Illumina), ki omogočajo procesiranje bistveno večjega števila sekvenc za vsak posamezen vzorec in raziskovanje metazdružb za tarčne organizme. Na tak način lahko karakteriziramo tudi taksone, ki so znotraj posamezne združbe manj številčni, in ki smo jih zaradi specifičnosti uporabljenih metod v tej raziskavi lahko spregledali.

V drugem delu raziskave, lončnem poskusu, smo spremljali razlike vpliva med dodanima vrstama inokuluma (naravni, komercialni), odmerkom gnojenja in vpliva fitofarmacevtskih sredstev (FFS) na število in dolžino poganjkov sadik ameriške borovnice sort 'Darrow', 'Duke' in 'Elliott'. Ugotovili smo, da na število in dolžino poganjkov vplivata vrsta inokuluma in odmerek gnojenja, medtem ko uporaba FFS, ni imela nobenega vpliva. Rezultati za število poganjkov so pokazali, da so se statistično značilne razlike med obravnavanji pojavile šele konec sezone 2013 in v sezoni 2014, kar je veljalo za vse tri obravnavane sorte borovnice. Pri dolžinah poganjkov so bile statistično značilne razlike za sorto 'Darrow' že v začetku rastne sezone 2013 in tudi sezone 2014, kasneje pa ne več. Pri sorti 'Duke' so bile statistično značilne razlike izmerjene od konca rastne sezone 2013 in čez celo rastno sezono 2014. Pri sorti 'Elliott' so bile največje razlike med obravnavanji na

začetku in na koncu sezone 2013, ter na začetku 2014. Vpliva gnojenja in vrste glivnega inokuluma na število poganjkov sta bila sortno specifična. Pri sortah 'Darrow' in 'Duke', smo ugotovili, da je število poganjkov bolj odvisno od gnojenja in da so bile razlike bolj očitne med različnimi odmerki gnojila, kot pri sami vrsti dodanega inokuluma. Pri sorti 'Elliott', je bil opazen večji vpliv samega inokuluma in tudi statistično značilne razlike v številu poganjkov med obravnavanji so se pojavile tekom celotnega opazovanja. Pri vplivu inokuluma in odmerkom gnojenja na dolžino poganjka je situacija drugačna. Pri vseh treh sortah se je v začetku opazovanja (sezona 2013) pokazal vpliv inokuluma, v drugi sezoni pa prevladuje vpliv gnojenja. Je pa zanimivo, da smo pri vseh sortah na začetku sezone 2013 opazili krajše poganjke ob dodatku komercialnega inokuluma, kot ob dodatku gozdnega inokuluma, proti koncu druge sezone pa so bila obravnavanja bolj izenačena, oz. se je ponekod razlika ravno obrnila. Podobne razlike so opazili že v starejših študijah, ko so ugotovili, da se različne sorte različno odzovejo na dodan inokulum, kar lahko nakazuje na kompatibilnost med rastlino in organizmi v inokulumu.

7.2 SUMMARY

Plantations of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) are rapidly spreading across the territory of the nature reserve of Ljubljana Marshes. With the drainage and agricultural use, acidic peat layer has become thinner over the years and consequently the groundwater level has risen. This situation, in addition to appropriate climate in the area, are ideal for growing blueberries, which is indicated also by the fact that the area of plantations of blueberries is still increasing (according to Eurostat, in 2012, 27.1 ha and 58,529 seedlings were grown in Ljubljana Marshes area). Despite the fact that the area is under natural protection act (since 2004 it is also categorised as Natura 2000), there is no information on the diversity and seasonal dynamics of the community composition of ericoid mycorrhizal fungi (such as e.g. *Hymenoscyphus ericae*, *Oidiodendron maius*, *Oidiodendron griseum*, and *Pezizella ericae*) in plantations of blueberries on the Ljubljana Marshes. In addition, there is no data available on the potential introduction of non-native fungi in the system with the introduction of new seedlings that are usually imported from abroad. Moreover, no information is available on how the variety of different agro-technical measures, such as application of fungicides, affect ericoid mycorrhiza on blueberry roots, without which blueberry may not uptake sufficient amount of nutrients for growth and development.

In the work performed within this thesis we sampled roots of newly imported blueberry seedlings, and roots from blueberry bushes from two plantations, aged 18 and 30 years that were sampled seasonally, first in October 2013, and then in April and June 2014. The aim was to study seasonal dynamic of endophytic root fungal communities in this area. In addition, the impact of fungicides, that are typically applied to this area, were studied. DNA was extracted from washed and homogenised roots, followed by fungal ITS region

amplification with polymerase chain reaction (PCR), using ITS1F and ITS4R primers, preparation of clone libraries and Sanger sequencing.

Using molecular identification, we have not found mycorrhizal fungi in blueberry roots growing in Ljubljana Marshes; however several saprophytic fungal taxa were identified from the root material, all from the phylum Basidiomycota. The highest diversity of fungi was found in the 18-year old and 30-year old blueberry field in the October 2013 sampling, with a distinct community composition between both locations. We found the fungi from the family Mycenaceae mainly occurring in the older plantation in autumn 2013 and spring 2014 samples, while this group of fungi was rare in the 18-year plantation. In addition, sequences of fungi from the order Trechisporales were frequent in both locations. These were more frequent in the younger plantation, which was confirmed for this location for all sampling dates. In the older plantation they were found only during the autumn sampling.

The reason, that mycorrhizal fungi have not been identified within this research could have been a long-term use of mineral fertilizers and plant protection products in the area. This was also confirmed by some other authors in their studies, where they found that in the plantations of blueberries (*V. corymbosum*), colonisation was very low (even below 6%), while in the natural habitat of forest blueberries (*Vaccinium uliginosum* and *V. myrtillus*) it can be over 40% (Kasurinen in Holopainen, 2001). We could confirm the presence of several types of saprophytic fungi, which may increase the availability of mineral nutrients to plants by decomposition of dead plant debris. These fungi belonged to the species *Mycena galopus*, *Mycena vitilis*, *Mycena algeriensis*, *Delicatula integrella*, *Sistotrema brinkmannii* and representatives of the order Trechisporales. All fungi belong in saprophytic group and some also form fruiting bodies. As mentioned in the earlier studies, they may be present on roots or in the rhizosphere of various heaths, including the blueberries in damp, acidic habitats like peat bogs, coniferous forests, etc. In addition to the above listed reasons, a possible explanation for not identifying the presence of ericoid mycorrhizal fungi in our research is that there were several problems with the methodology used. In the soil, especially those with a high content of organic substances such as marshes, inhibitors may be present, which can affect success of the amplification of the marker gene in the PCR. In general, the method of cloning and Sanger sequencing is being replaced by new high-throughput sequencing methods (e.g. Illumina), which allow the processing of much higher number of sequences for each sample, and offer exploration of metacommunities of the target organisms. In this way, we can also characterize taxa that are less numerous within a community, and which we may have overlooked due to the specifics of the methods used.

In the second part of our research, a pot experiment was set, where we followed the impacts of two distinct inoculation types (with natural and commercial inocula), fertilisation, and the impact of fungicide treatment on the shoot number and shoot length of

three, 'Darrow', 'Duke' and 'Elliott', blueberry cultivars. Significant impact of the inoculum and fertilisation type was found for the shoot number, while no influence was found for the fungicide application. Differences in the shoot number among treatments were found in the end of the growth season 2013 and throughout the season 2014. This was observed in all the cultivars. Differences in the shoot length for the cultivar 'Darrow' were found already at the beginning of the season 2013 and the trend continued into the beginning of the season 2014, while they were lost latter in the year. In the cultivar 'Duke' differences were measured in the end of the season 2013 and throughout 2014. In 'Elliott' the highest differences in shoot length among the treatments were found in the beginning and end of the 2013, and in the beginning of 2014. In the cultivars 'Darrow' and 'Duke' the shoot number depended more on the fertilisation type than inoculation. In 'Elliott' a higher level of impact of the inoculation was observed. A different trend was observed for the shoot lengths. In all three cultivars an impact of inoculation was observed in the beginning of the season 2013, while in the second season a higher impact of fertilisation on shoot length was observed. An interesting observation is also, that in all the cultivars longer shoots were measured in the beginning of the season 2013 compared to the length in the season 2014. Similar species specific responses to the inoculation with mycorrhizal fungi were observed also in other studies. Among other possible reasons, this could also be a consequence of distinct compatibility among the cultivars and fungal taxa in the inocula.

8 VIRI

- Allen T. R., Millar T., Berch S. M., Berbee M. L. 2003. Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 160: 255–272.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410
- Analiza stanja za opredelitev problematike in potencialov za razvoj in trženje trajnostnega turizma v Krajinskem parku Ljubljansko barje - Priloga št. 1. Strategija trajnostnega razvoja in trženja Krajinskega parka Ljubljansko barje kot turistične destinacije 2011–2015. 2009. Mestna občina Ljubljana: 131 str.
http://www.ljubljanskobarje.si/uploads/datoteke/turizem_analiza.pdf. (5. maj 2015)
- Batič F., Šircelj H., Turk B. 2004. Pregled rastlinskega sistema (Delovna verzija, za interno uporabo). 2004. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 119 str.
- Bernicchia A., Savino E., Gorjon S. P. 2007. Aphyllophoraceous wood-inhabiting fungi on *Pinus* spp, in Italy. *Mycotaxon*, 101: 5-8
- Bizabani C., Dames J.F. 2015a. The diversity of ericaceous root fungi in South Africa: a comparative approach. Eighth international conference on mycorrhiza, 3-7 august 2015, Flagstaff, Arizona, USA: 213 str.
- Bizabani C., Dames J.F. 2015b. Effects of inoculating *Lachnum* and *Cadophora* isolates on the growth of *Vaccinium corymbosum*. *Microbiological Research*, 181: 68-74
- Boyer E. P., Ballington J. R., Mainland C. M. 1982. Endomycorrhizae of *Vaccinium corymbosum* L. in North Carolina. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 107, 5: 751-754
- Carrillo R., Guerrero J., Rodríguez M., Gergichevich C. M. 2015. Colonization of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets by ericoid mycorrhizae under nursery conditions. *Ciencia Investigacion Agraria*, 42, 3: 365-374
- Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. 1992. *Official Journal of the European Union*, 2, L 206: 102-145

- Council Directive 79/409/EEC of 2 April 1979 on the conservation of wild birds. 1979.
Official Journal Official Journal of the European Union, L 103: 1-18
- Drummond A. J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M.,
Heled, J., Kears M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T.,
Wilson A. 2011. Geneious version 5.5.7, Biomatters
<http://www.geneious.com/> (17. nov. 2015)
- Filimon M. N., Voia S. O., Isvoran A., Popescu R. in Ostafe V. 2015.
<http://www.sgml.org/sgemlib/spip.php?article6718> (20. jan. 2016)
- GERK. Javni pregledovalnik grafičnih podatkov MKGP. Ljubljana, Ministrstvo za
kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.
[http://rkg.gov.si/GERK/Viewer/#map_x=450257.6875&map_y=89863.5625&map_sc=3571&layers=Rastri,DOF](http://rkg.gov.si/GERK/Viewer/#map_x=450257.6875&map_y=89863.5625&map_sc=3571&layers=Rastri,DOFclient,REZI,REZI250,REZI25,REZI5,RABA,GERK_SDO,KS_OLD,RPGV)
client,REZI,REZI250,REZI25,REZI5,RABA,GERK_SDO,KS_OLD,RPGV (20. nov.
2015)
- Gianinazzi-Pearson W., Bonfante-Fasolo P. 1996. Variability in wall structure in
mycorrhizal behaviour of ericoid fungal isolates, V: Physiological and genetical aspects
of mycorrhiza. INRA: 563-567
- Gough R. E. 1980. Root distribution of 'Coville' and 'Lateblue' highbush blueberry under
sawdust mulch. Journal of American Society of Horticultural Science, 105: 576-578
- Goulart B. L., Schroeder M. L., Demchak K. L., Lynch J. P., Darnell R. L., Clark J. R.,
Wilcox W. F. 1993. Blueberry mycorrhizae: current knowledge and future directions.
Acta Horticulturae, 346: 230-239
- Golldack J., Schubert R., Tauschke M., Schwarzel H., Hofflich G., Lentzsch P.,
Munzenberger B. 2001. Mycorrhization and plant growth of highbush blueberry
(*Vaccinium corymbosum* L.) on arable land in Germany.
http://mycorrhiza.ag.utk.edu/latest/icom3/ICOM3_golldack.htm (10. jan. 2016)
- Hacin J., Čop J., Mahne I. 2001. Nitrogen mineralization in marsh meadows in relation to
soil organic matter content and watertable level. Journal of Plant Nutrition and Soil
Science, 164: 503-509
- Hallenberg N. 1991. Pairing tests with species of Aphyllophorales (Basidiomycetes) from
two phytogeographically isolated areas. Mycotaxon, 42: 355-386

- Jukes T. H., Cantor C. R. 1969. Evolution of protein molecules. V: Mammalian protein metabolism. Munro H. N. (ed.). New York, Academic Press: 21-132
- Kasurinen A., Holopainen T. 2001. Mycorrhizal colonization of highbush blueberry and its native relatives in central Finland. *Agricultural and Food Science*, 10: 113-119
- Kerley S. J., Read D. J. 1995. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XVIII. Chitin degradation by *Hymenoscyphus ericae* and transfer of chitin-nitrogen to the host plant. *New Phytologist*, 131: 369-375
- Koron D. 2008. Vpliv mikoriznih gliv na rast jagodičastih sadnih rastlin. V: Zbornik referatov 2. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 31. jan. – 2. feb. 2008. Hudina M. (ur.), Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije: 459-467
- Kunkel D. Soil, wood decaying fungus (*Sistotrema brinkmannii*). Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Kailua, USA
<http://www.denniskunkel.com/detail/14081.html>. (10. november 2015)
- Kuo M. 2010. Mycenoid mushrooms. MushroomExpert.com
<http://www.mushroomexpert.com/mycenoid.html>. (10. november 2015)
- Legendre P., Legendre L. 1998. Numerical ecology. 2nd ed., Amsterdam, Elsevier: 852 str.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan J., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc-Krajšek S., Trčak B., Bačič M., Fischer M. A., Eler K., Surina B. 2010. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. 4. dopolnjena in spremenjena izd., 2. natis. Martinčič A. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Münzenberger B., Schneider B., Nilsson R. H., Bubner B., Larsson K. H., Hüttel R. F. 2012. Morphology, anatomy, and molecular studies of the ectomycorrhiza formed axenically by the fungus *Sistotrema* sp. (Basidiomycota). *Mycological Progress*, 11: 817-826
- Nilsson R. H., Larsson K. H., Larsson E., Kõljalg U. 2006. Fruiting body-guided molecular identification of root-tip mantle mycelia provides strong indications of ectomycorrhizal associations in two species of *Sistotrema* (Basidiomycota). *Mycological Research*, 110: 1426-1432

- Oblak M. 1996. Ameriške borovnice – Razvoj rastline in gojenje. Dreu S. (ur.). Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 122 str.
- Ogris N. 2004. *Boletus iformaticus*. *Mycena*.
http://www.zdravgozd.si/bi_karte_seznam.aspx (6. maj 2016)
- Parker D. C. 2013. Diversity and Rate of Infection of Ericoid Mycorrhizal Fungi that Colonize *Rhododendron maximum* along an Elevational Gradient and Their Potential to Degrade Poly-aromatic Hydrocarbons Using Lignin Degrading Enzymes. The degree of Master of Science, Department of Biology, Appalachian State University, Boone, USA: 62 str.
- Parker S., O'Reilly P. First nature. *Delicatula integrella* (Pers.) Fayod. Wales.
<http://www.first-nature.com/fungi/delicatula-integrella.php> (3. februar 2016)
- Perotto S, Perotto R., Faccio A., Schubert A., Varma A., Bonfante P., 1995, Ericoid mycorrhizal fungi: cellular and molecular bases of their interactions with host plant. Canadian Journal of Botany, 73: 557-568
- Read D. J. 1984. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. V: The ecology and physiology of the fungal mycelium, Symposium of the British Mycological Society, Bath, 11-15 April 1984. Rayner D. H., Jennings A. D. M. (eds.). New York, Cambridge University Press: 215-240
- Read D. J., Kerley S. 1995. The status and function of ericoid mycorrhizal systems. V: Mycorrhizas. Structure, function, molecular biology and biotechnology, Springer-Verlag: 499-520
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation For Statistical Computing.
<http://www.R-project.org> (17. nov. 2015)
- Robich G., 2003. *Mycena d'Europa*. Associazione Micologica Bresadola, Trento: 728 str.
- Scagel C. F. 2003. Mycorrhizal status of sand-based cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) bogs in southern Oregon. Small Fruits Review, 2: 31-41
- Scagel C. F. 2005. Inoculation with ericoid mycorrhizal fungi alters fertilizer use of highbush blueberry cultivars. HortScience, 40, 3: 786-794

- Scagel C.F., Yang W.Q. 2005. Cultural variation and mycorrhizal status of blueberry plants in NW Oregon commercial production fields. *International Journal of Fruit Science*, 5: 85-111
- Scagel C.F., Wagner A., Winiarski P. 2005a. Frequency and intensity of root colonization by ericoid mycorrhizal fungi in nursery production of blueberry plants. *Small Fruits Review*, 4: 95-112
- Scagel C.F., Wagner A., Winiarski P. 2005b. Inoculation with ericoid mycorrhizal fungi alters root colonization and growth in nursery production of blueberry plants from tissue culture and cuttings. *Small Fruits Review*, 4: 113-35
- Schukla A. K. 2000. Impact of fungicides on soil microbial population and enzyme activities. *Acta Botanica Indica*, 28: 85-87
- Score 250 EC. Syngenta. Proizvodi.
http://www3.syngenta.com/country/si/sl/Syngenta_programi/varstvo-rastlin/Proizvodi/Pages/Score_250_EC.aspx (20. okt. 2015)
- Silva A., Patterson K., Rothrock C., Moore J. 2000. Growth promotion of highbush blueberry by fungal and bacterial inoculants. *HortScience*, 35, 7: 1228-1230
- Signum. BASF. Crop protection product catalogue.
http://www.agro.basf.hr/agroportal/hr/hr/crop_protection/crop_protectionproduct_catalogue/product_details_1416.html (20. oktober 2015)
- Smith S. E., Read D. J. 2008. Ericoid mycorrhiza. V: *Mycorrhizal symbiosis* (third edition), Elsevier Ltd.: 389-418
- Sokolovski S. G., Mehargand A. A., Maathuis F. J. M. 2002. *Calluna vulgaris* root cells show increased capacity for amino acid uptake when colonized with the mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. *New Phytologist*, 155: 525-530
- Spiers J. M. 1995. Substrate temperatures influence root and shoot growth of southern highbush and rabbiteye blueberries. *HortScience*, 30, 5: 1029-1030
- Statistični urad Republike Slovenije. Število kmetijskih gospodarstev, dreves ali grmov ter bruto in neto površina po sadnih vrstah, Slovenija, po letih za leto 2012.
<http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> (15. maj 2015)

Stribley D. P., Read D. J. 1976. The biology of mycorrhiza in the Ericales. VI. The effect of mycorrhizal infection and concentration of ammonium nitrogen on growth of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) in sand culture. *New Phytologist*, 77: 63-72

Switch 62,5 WG. Syngenta. Proizvodi.

http://www3.syngenta.com/country/si/sl/Syngenta_programi/varstvo-rastlin/Proizvodi/Pages/Switch_62,5_WG.aspx (20. oktober 2015)

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882

Thormann M. N., Rice A. V. 2007. Fungi from peatlands. *Fungal Diversity*, 24: 241-299

Trilar T. 2001. Zgodovina Ljubljanskega barja. V: Narava Slovenije. Ljubljansko barje in Iška. Gogala A. (ur.). Ljubljana, Prirodoslovni muzej: 11-17

Uredba o habitatnih tipih. 2003. Ur. l. RS Št. 112/03

Uredba o posebnih varstvenih območjih (območjih Natura 2000). 2004. Ur. l. RS Št. 49/04

Uredba o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah. 2004. Ur. l. RS Št. 46/04

Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah. 2004. Ur. l. RS Št. 46/04

Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T. J., Watson I. J., Duck J. M., Fitter A. H., Young Y.P. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11: 1555–1564

Vega A. R., Garcia M., Rodriguez A., Prat L., Mella J. 2009. Blueberries Mycorrhizal Symbiosis Outside of the Boundaries of Natural Dispersion for Ericaceous Plants in Chile. *Acta Horticulturae*, 810: 665-671

Vohnik M., Albrechtova J., Vosatka M. 2008. The application of inoculate based on ericoid mycorrhizal, DSE and saprotrophic fungi in conventional, semi-conventional, semi-organic and organic cultivation of highbush blueberries. V: *Mycorrhiza works*. Feldmann F., Kapulnik Y., Baar J. (eds.). Braunschweig, Germany, Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft: 173-185

- Vohnik M., Sadowsky J.J., Lukesova T., Albrechtova J., Vosatka M. 2012a. Inoculation with wood decomposing basidiomycete, but not with root symbiotic ascomycetes, positively affects growth of highbush blueberry (Ericaceae) grown in a pine litter substrate. *Plant and Soil*, 355: 341-52
- Vohnik M., Sadowsky J. J., Kohout P., Lhotakova Z., Nestby R., Kolarik M., 2012b. Novel root-fungus symbiosis in Ericaceae: Sheathed ericoid mycorrhiza formed by a hitherto undescribed Basidiomycete with affinities to Trechisporales. *PLoS ONE*, 7, 6, doi: 10.1371/journal.pone.0039524: 16 str.
- Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5261–5267
- Yang W. Q., Goulart B. L., Demchak K. 1998. Mycorrhizal infection and plant growth if high bush blueberry in fumigated soil following soil amendment and inoculation with mycorrhizal fungi. *HortScience*, 33, 7: 1136-1137
- Zakon o ohranjanju narave. 2004. Ur. l. RS Št. 96/04
- Zuur A. F., Ieno E. N., Smith G. M. 2007. *Analysing ecological data*. Springer: 672 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Ireni Maček za vso spodbudo, pomoč in usmerjanje med opravljanjem magistrske naloge.

Rad bi se zahvalil tudi kolegici asist. dr. Nataši Šibanc, ki me je vodila čez vse postopke laboratorijskega dela in ostale analize, ter pomoč pri pisanju magistrske naloge

Zahvalil bi se tudi predstojniku katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko, prof. dr. Dominiku Vodniku, ki mi je strokovno pregledal in ocenil nalogo.

Zahvalil bi se tudi zaposlenim iz Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko in Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, predvsem Nataši Hren, za strpnost in pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvalil bi se tudi podjetju Jele Kitt d.o.o. za dovoljenje za opravljanje poskusa v njihovem nasadu.

Največja zahvala gre mojim najbližjim, ki so mi stali ob strani in me spodbujali pri dokončanju magistrske naloge.

PRILOGA A

Analiza tal za lokacijo vzorčenja 1 (nasad 30 let).



Kmetijski inštitut Slovenije

Agricultural Institute of Slovenia

Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana

Slovenija/Slovenia

T +386 (0)1 280 52 62 | F +386 (0)1 280 52 55 | E info@kis.si

www.kis.si



SLOVENSKA
AKREDITACIJA
SIST EN ISO/IEC 17025
LP-020

Rezultati označeni z # se nanašajo
na neakreditirano dejavnost

JELE KITT D.O.O.

Ljubljana, 26.03.15

POT V JELE 5
1353 BOROVNICA

POROČILO O PRESKUSU št.: 01065/2015

Opis vzorca: ZEMLJA

VZOREC 1 - STARI NASAD

Analitska številka: 15-01065

Datum prejema vzorca: 13.03.15

Datum izvajanja preskusa: 26.03.15

REZULTATI ANALIZE:

Parameter	Enota	V zračno sušem vzorcu	Metoda	Referenca
pH v KCl	-	3,7	MET/Z/001	ISO 10390:2005
P2O5 (dostopni)	mg/100g	30 #	MET/Z/016	INTERNA METODA
K2O (dostopni)	mg/100g	30 #	MET/Z/017	INTERNA METODA

Odgovorni analitik:

mag. Vida Žnidaršič Pongrac, univ.dipl.kem.



Vsi vzorci vzeti do 40 cm globine!

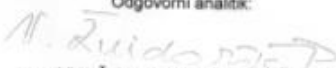
Rezultati analize se nanašajo izključno na preskušane vzorce. Razmnoževanje tega dokumenta ni dovoljeno razen v celoti kot faksimile.
SA je podpisnik multilateralnega sporazuma med EA (European co-operation for Accreditation) in ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) za medsebojno priznavanje enakovrednosti poročil o testiranjih in analizah.

Oznaka: SOP-CL-044 Z3

Stran 1 od 1

PRILOGA B

Analiza tal za lokacijo vzorčenja 2 (nasad 18 let).

 Kmetijski inštitut Slovenije Agricultural Institute of Slovenia Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana Slovenija/Slovenia T +386 (0)1 280 52 62 F + 386 (0)1 280 52 55 E info@kis.si www.kis.si	 SLOVENSKA AKREDITACIJA SST EN ISO/IEC 17025 LP-020 Rezultati označeni z # se nanašajo na neakreditirano dejavnost																				
JELE KITT D.O.O. POT V JELE 5 1353 BOROVNICA	Ljubljana, 26.03.15																				
POROČILO O PRESKUSU št.: 01066/2015																					
Opis vzorca: ZEMLJA VZOREC 2 - ZA BARAKO																					
Analitska številka: 15-01066																					
Datum prejema vzorca: 13.03.15																					
Datum izvajanja preskusa: 26.03.15																					
REZULTATI ANALIZE:																					
<table border="1"><thead><tr><th>Parameter</th><th>Enota</th><th>V sušeno sušem vzorcu</th><th>Metoda</th><th>Referenca</th></tr></thead><tbody><tr><td>pH v KCl</td><td>-</td><td>3,8</td><td>MET/Z/001</td><td>ISO 10390:2005</td></tr><tr><td>P2O5 (dostopni)</td><td>mg/100g</td><td>26 #</td><td>MET/Z/016</td><td>INTERNA METODA</td></tr><tr><td>K2O (dostopni)</td><td>mg/100g</td><td>30 #</td><td>MET/Z/017</td><td>INTERNA METODA</td></tr></tbody></table>	Parameter	Enota	V sušeno sušem vzorcu	Metoda	Referenca	pH v KCl	-	3,8	MET/Z/001	ISO 10390:2005	P2O5 (dostopni)	mg/100g	26 #	MET/Z/016	INTERNA METODA	K2O (dostopni)	mg/100g	30 #	MET/Z/017	INTERNA METODA	
Parameter	Enota	V sušeno sušem vzorcu	Metoda	Referenca																	
pH v KCl	-	3,8	MET/Z/001	ISO 10390:2005																	
P2O5 (dostopni)	mg/100g	26 #	MET/Z/016	INTERNA METODA																	
K2O (dostopni)	mg/100g	30 #	MET/Z/017	INTERNA METODA																	
Odgovorni analitik:  mag. Vida Žnidaršič Pongrac, univ. dipl. kem.																					
																					
Rezultati analize se nanašajo izključno na preskušene vzorce. Razmnoževanje tega dokumenta ni dovoljeno razen v celoti kot besedilo. SA je podpisnik multilateralnega sporazuma med EA (European co-operation for Accreditation) in ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) za medsebojno prilagoditev enotnosti rezultatov pri testiranjih in analizah.																					
Oznaka: SOP-CL-044 Z3	Stran 1 od 1																				

PRILOGA C

Poročilo k analizam tal.



Kmetijski inštitut Slovenije

Agricultural Institute of Slovenia

Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana

Slovenija/Slovenia

T +386 (0)1 280 62 62 | F +386 (0)1 280 52 55 | E info@kis.si

www.kis.si



JELE KITT d.o.o.

Pot v Jele 5

Ljubljana, 13. april 2014

1353 BOROVNICA

ZADEVA: Komentar k rezultatom kemijskih analiz (15-01065 do 15-01068)

Na podlagi opravljenih analiz v vzorcih tal Vam priporočamo gnojenje parcel z naslednjimi odmerki hranil v organskih in mineralnih gnojilih skupaj:

Analitska številka	Opis parcele	Pred začetkom rasti kg/ha	
		P ₂ O ₅	K ₂ O
15-01065	STARI NASAD	20	70
15-01066	ZA BARAKO	20	70
15-01067	OB KOLOVOZU	20	70
15-01068	SREDNJI DEL	40	70

Za lažje razumevanje rezultatov analiz navajamo optimalne vrednosti obravnavanih parametrov v tleh:

pH	za borovnice: 3,5-4,5
P ₂ O ₅ dostopni	13-25 mg P ₂ O ₅ /100g tal
K ₂ O dostopni	20-30 mg K ₂ O/100g tal

Gnojenje s fosforjem (P₂O₅) in kalijem (K₂O) opravite takoj pomladi v začetku rasti enakomerno po celotni površini. Gnojenje opravite z ustreznimi, vam dostopnimi mineralnimi gnojili. Kislost tal (pH) je za rast ameriških borovnic ustrezna.

Priporočene odmerke hranil je potrebno preračunati na dejansko površino posameznega nasada ter na količino vam dostopnih gnojil. Za morebitna dodatna pojasnila smo Vam na voljo (01-2805-152).

Janez SUŠIN, univ. dipl. inž. agr.

PRILOGA Č

Tehnična specifikacija kupljenega inokuluma Rhodovit® (Symbiom, Republika Češka).



Technical Specification Sheet – RHODOVIT®

Manufacturer: Symbio-m Ltd., Sazava 170, Czech Republic

Type of material – Beneficial mycorrhizal fungi for ericaceous plants

Description of the product RHODOVIT®

The Product contains reproductive particles of three strains of ericoid mycorrhizal fungi species in the form of mycelia bound on a sterile agar component and an inert substrate mix of peat and small amendments of bioadditive component, which ensure the proper development of mycorrhizal symbiosis and the growth of the plants until a functional network of fungal mycelium in the soil is established.

Composition:

(A) Bioactive particles (mycelium fragments) of three mycorrhizal fungi naturally occurring in European soils:

Mycelium of three ericoid mycorrhizal fungi bound on agar based media:

- *Oidiodendron maius*
- *Hymenoscyphus ericae strain 1*
- *Hymenoscyphus ericae strain 2*

Concentration:

minimum number of infective units: 1.800 per L

(B) Peat carrier and bioadditive component: (fine peat, natural minerals, seaweed extracts and powdered biodegradable water-storing polymer granules)

Fine peat	36%
Keratin.....	9%
Apatite	7%
Alginates (seaweed).....	2%
Chitin	1%
Water-storing granules.....	45%

**We declare that the product does not contain genetically engineered material.
The product is free of pathogens.**

Method of production:

Pure cultures are isolated from colonized roots and grown on agar medium for 4 weeks. The cultures are then cultivated on a sterilized liquid medium. When matured, the cultures are poured into sterile plastic bags. The dry component is prepared separately. The final product includes dry component with powdered water-storing granules and mixture of mycorrhizal fungi on a liquid medium.

Use and effect of the product:

Application of RHODOVIT® when planting (as per manufacturer's directions) will give ericaceous plants their best growth potential, sustainable plant nutrition, reduced plant mortality at transplanting, greater drought and salt tolerance, reduced need of fertilization, and increased resistance to environmental stress.