

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Darinka KORON

**POMEN ALTERNATIVNIH METOD RAZKUŽEVANJA TAL  
ZA RAZVOJ ARBUSKULARNE MIKORIZE JAGODE  
(*Fragaria x ananassa* Duch.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Darinka KORON

**POMEN ALTERNATIVNIH METOD RAZKUŽEVANJA TAL ZA  
RAZVOJ ARBUSKULARNE MIKORIZE JAGODE  
(*Fragaria x ananassa* Duch.)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**IMPORTANCE OF ALTERNATIVE SOIL DISINFECTION FOR  
ARBUSCULAR MYCORRHIZA OF STRAWBERRY  
(*Fragaria x ananassa* Duch.)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Doktorska naloga je zaključek podiplomskega študija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Naloga je bila opravljena na Kmetijskem inštitutu Slovenije, kjer je v sklopu Poskusnega sadovnjaka na Brdu pri Lukovici potekal poljski poskus in v rastlinjakih inštituta, kjer so potekali lončni poskusi. Molekulska identifikacija gliv je potekala na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico doktorske naloge imenovala prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc ŠTAMPAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Marjana REGVAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Franci Aco CELAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Datum zagovora: 10. 1. 2014

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Darinka Koron

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd  
DK UDK 581.1:634.753(043.3)=163.6  
KG jagoda/razkuževanje tal/biofumigacija/solarizacija/arbuskularna mikoriza/temni septirani endofiti/mikorizna kolonizacija/TTGE/rast/pridelek/pleveli  
AV mag. KORON, Darinka, univ. dipl. ing. agr.  
SA REGVAR, Marjana (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta  
LI 2014  
IN Pomen alternativnih metod razkuževanja tal za razvoj arbuskularne mikorize jagode (*Fragaria x ananassa* Duch.)  
TD Doktorska disertacija  
OP XII, 113 str., 21 pregl., 23 sl., 22 pril., 236 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Vpliv biofumigacije in solarizacije na rast in rodnost jagod (*Fragaria x ananassa* Duch.) ter razvoj arbuskularne mikorize, smo v lončnih in poljskem poskusu primerjali s kemičnim razkuževanjem z dazometom in kontrolo. V lončnih poskusih smo polovici rastlin dodali naravni mikorizni inokulum. Biofumigacijo smo izvedli z rastlinami *Brassica juncea* (Bj), *Sinapis alba* (Sa) in *Eruca sativa* (Es). Solarizacijo smo izvedli s toplotno obdelavo zemlje na 37 °C (200 ur). V poljskem poskusu smo biofumigacijo izvedli z rastlinami (Bj, Sa in Es) ter nebiocidno rastlino *Vicia faba* var. *minor* (Vf). Tla smo solarizirali s prekrivanjem s črno in prozorno folijo (6 in 9 tednov). Biofumigacija in solarizacija sta imeli na rast in rodnost jagod v lončnih poskusih, v primerjavi z dazometom pozitiven vpliv, v primerjavi s kontrolo pa sta bili večji ali enaki. V povprečju je bila najbolj učinkovita biocidna rastlina Sa. V poljskem poskusu biofumigacija in solarizacija nista imeli vpliva na rast in rodnost. Biofumigacija je v lončnih poskusih vplivala na povečanje organske snovi in posameznih hranil v substratih. Na manjše število plevelov je v lončnih poskusih vplivala Sa, vendar delovanje ni bilo enako dazometu. Ostala obravnavanja so bila izenačena s kontrolo. V poljskem poskusu statistično značilnih razlik v številu plevelov med obravnavanji ni bilo, kljub temu da je bil učinek solarizacije s prozorno folijo enak učinku dazometa. Vpliv razkuževanja na DSE in nepoznane koreninske endofite je bil v vseh poskusih neizrazit. Z biocidnimi rastlinami smo v zemljo vnesli različne vrste in količine glukozinolatov, ki so na mikorizno kolonizacijo v lončnih poskusih različno delovali. V primerjavi s kontrolo, na parametre mikoriznosti (frekvenca in intenziteta mikorize, gostota arbuskulov) niso vplivali, razen v drugem poskusu v obravnavanjih Bj in Sa. V poljskem poskusu vplivov na mikorizno kolonizacijo ni bilo. Frekvenca mikorize je bila v naših poskusih zelo velika, z izjemo v obravnavanjih z dazometom. Razmerja pri ostalih parametrih mikoriznosti so bila podobna frekvenci. Solarizacija ni vplivala na spremembe mikorizne kolonizacije. Prozorna folija in daljše obdobje prekrivanje tal sta imeli večji, vendar ne statistično značilen vpliv na manjšo prisotnost mikoriznih gliv. Dazomet je v lončnih poskusih preprečil mikorizno kolonizacijo, v poljskem poskusu pa vpliva ni bilo. Ob dodatku mikoriznega inokuluma je bila, mikorizna kolonizacija v lončnih poskusih v vseh obravnavanjih enaka kontroli. Z molekulskimi tehnikami PCR in TTGE smo delno identificirali vrste gliv *Glomus* spp. in *Rhizoctonia* sp. Biocidna rastlina Es je vplivala na manjšo diverzitetu arbuskularne mikorize. Prisotnosti DSE gliv nismo potrdili.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
DC UDC 581.1:634.753(043.3)=163.6  
CX Strawberry/soil disinfection/biofumigation/solarization/ arbuscular mycorrhiza/dark septate endophyte/mycorrhizal colonization/TTGE/growth/ yield/ weeds  
AU M.Sc. KORON, Darinka, univ. dipl. ing. agr.  
AA REGVAR, Marjana (supervisor)  
PP SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2014  
TI Importance of alternative soil disinfection for arbuscular mycorrhiza of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.)  
DT Doctoral dissertation  
NO XII, 113 p., 21 tab., 23 fig., 22 ann., 236 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The impact of biofumigation and solarization on strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) growth, yield, and arbuscular mycorrhiza in pot and field experiment was compared to the chemical disinfection with dazomet and to the control treatment. Half of the plants in the pot experiments were inoculated with natural mycorrhizal inoculum. Biofumigation was performed by adding the *Brassica juncea* (Bj), *Sinapis alba* (Sa) and *Eruca sativa* (Es) ground plants. Solarization was performed by soil heating to 37 °C (200 hours). Biofumigation in the field experiment was carried out with biocidal plants (Bj, Sa and Es) and the non-biocidal plant *Vicia faba* var. *minor* (Vf). Solarization was carried out with black and transparent foil covering (6 and 9 weeks). In comparison to dazomet, biofumigation and solarization in pot experiments had positive influence on growth and yield, but in comparison to the control, the growth and yield were better or the same. On average, the most effective biocidal plant was Sa. In the field experiment biofumigation and solarization had no impact on growth and yield. In the pot experiments biofumigation resulted in the increase of organic matter and nutrients in substrates. Sa reduced the number of weeds in the pot experiments, but not the same as chemical disinfection. Other treatments have been equalized with the control. There was no differences in the field experiment between treatments even solarization with transparent foil had the same impact on weeds as dazomet. The impact of disinfection on DSE and unknown root endophytes was unexpressed. Depending on biocidal plant, different types and amount of glucosinolates were incorporated into the soil and affect mycorrhizal colonization in trials. In comparison to the control parameters of mycorrhiza (frequency, intensity of colonisation, arbuscular density) had no impact, except in the second experiment, the treatment Bj and Sa. In the field experiment there was no impact on mycorrhizal colonization. In our experiments the frequency of mycorrhiza, except in the dazomet treatment, was very high. The relations in other mycorrhizal parameters were very similar to frequency. Solarization has no impact on mycorrhizal colonization. Transparent foil and a longer period covering the soil had a great, but not statistical significant impact on the mycorrhizal fungi. In pot experiment dazomet prevent mycorrhizal colonization, but not in the field experiment. Treatments with mycorrhizal inoculums have the same mycorrhizal colonization as the control. With molecular techniques PCR and TTGE we identified *Glomus* spp. in *Rhizoctonia* sp. Biocidal plant Es affected the diversity of arbuscular mycorrhiza. DSE fungi were not identified.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Klasične tehnologije priprave tal.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Kolobarjenje.....	3
2.1.2 Zaporedno sajenje.....	4
<b>2.2 Alternativne tehnologije priprave tal.....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Nova kemična sredstva za razkuževanje tal.....	6
2.2.2 Nekemični načini razkuževanja tal.....	7
2.2.2.1 Solarizacija.....	7
2.2.2.2 Biofumigacija.....	9
2.2.2.2.1 Biocidne rastline.....	10
2.2.2.2.2 Glukozinolati.....	11
2.2.3 Druga alternativna sredstva za razkuževanje tal.....	12
<b>2.3 Odziv rastlin in MO v tleh na alternativne metode razkuževanja tal.....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Mikoriza.....	13
2.3.1.1 Arbuskularna mikoriza pri jagodah.....	14
2.3.2 Temni septirani endofiti.....	15
2.3.3 Škodljive glive na koreninah jagod.....	16
2.3.4 Interakcija med mikoriznimi glivami in škodljivimi organizmi.....	16
<b>2.4 Določanje AM in DSE gliv.....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Konvencionalno in molekulsko določanje AM gliv.....	17
2.4.2 Določanje DSE in ostalih koreninskih endofitov.....	18
<b>3 NAMEN IN HIPOTEZE.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Namen.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Hipoteze.....</b>	<b>21</b>
<b>4 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Lončni poskusi.....</b>	<b>22</b>
4.1.1 Zasnova poskusov.....	22
4.1.2 Vzgoja mikoriznega inokuluma.....	22
4.1.3 Priprava substratov oz. mešanic zemlje.....	22
4.1.3.1 Substrati z biocidnimi rastlinami (Bj, Sa, Es).....	23
4.1.3.2 Solarizacija – toplotno obdelana zemlja (SOL).....	24
4.1.3.3 Dazomet - kemično razkužena zemlja (D).....	24
4.1.3.4 Kontrola (K).....	24
4.1.4 Gojenje sadik.....	24
4.1.5 Spremljanje parametrov rasti in razvoja jagod.....	25
4.1.6 Spremljanje parametrov rodnosti.....	25
4.1.7 Rast plevelnih rastlin.....	25
4.1.8 Ocenjevanje parametrov mikorizne in nemikorizne kolonizacije.....	25

4.1.8.1	Odvzem korenin.....	25
4.1.8.2	Barvanje korenin z barvilom tripan modro.....	26
4.1.8.3	Priprava preparatov za mikroskopiranje.....	26
4.1.8.4	Ocena kolonizacije korenin jagod z mikorizo.....	26
4.1.8.5	Ocena veziklov AM.....	27
4.1.8.6	Ocena DSE in nepoznanih koreninskih endofitov.....	27
4.1.8.7	Fotografiranje preparatov.....	27
4.1.9	Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za glomeromicete.....	27
4.1.9.1	Odbira in odvzem vzorcev.....	27
4.1.9.2	Izolacija DNA iz korenin.....	28
4.1.9.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	28
4.1.9.3.1	PCR z začetnima oligonukleotidoma AM1 in NS31.....	28
4.1.9.3.2	PCR z začetnima oligonukleotidoma MH2 in MH4.....	29
4.1.9.3.3	Elektroforeza na agaroznem gelu.....	29
4.1.9.3.4	Pomnoževanje za TTGE.....	30
4.1.9.4	TTGE.....	31
4.1.9.4.1	Priprava gela za analizo TTGE.....	31
4.1.9.4.2	Nanos vzorcev.....	32
4.1.9.4.3	Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu.....	32
4.1.9.4.4	Ocena diverzitete gliv na osnovi TTGE profilov.....	32
4.1.9.4.5	Izolacija DNA iz TTGE gela.....	32
4.1.9.4.6	Kloniranje.....	33
4.1.9.4.7	Sekvenciranje.....	33
4.1.10	Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi za regijo ITS.....	34
4.1.10.1	Odbira vzorcev.....	34
4.1.10.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	34
4.1.10.2.1	PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 1 f in ITS 4.....	34
4.1.10.2.2	Elektroforeza na agaroznem gelu.....	35
4.1.10.2.3	PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 4 in ITS 3 GC.....	35
4.1.10.3	TTGE.....	36
4.1.10.3.1	Izolacija DNA iz TTGE gela.....	36
4.1.10.3.2	Kloniranje in sekvenciranje.....	36
<b>4.2</b>	<b>Poljski poskus.....</b>	<b>37</b>
4.2.1	Zasnova poskusa.....	37
4.2.2	Lastnosti tal pred obdelavo.....	37
4.2.3	Načini obdelave tal za posamezna obravnavanja.....	37
4.2.3.1	Biocidne rastline.....	38
4.2.3.2	Solarizacija.....	38
4.2.3.3	Kemično razkuževanje tal.....	39
4.2.3.4	Kontrola.....	39
4.2.4	Sadilni material in sajenje.....	39
4.2.5	Spremljanje parametrov rasti in razvoja jagod.....	39
4.2.6	Spremljanje parametrov rodnosti.....	40
4.2.7	Zapleveljenost.....	40
4.2.8	Ocenjevanje parametrov mikorizne in nemikorizne kolonizacije.....	40
<b>4.3</b>	<b>Obdelava podatkov.....</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>41</b>

<b>5.1</b>	<b>Lončni poskusi.....</b>	<b>41</b>
5.1.1	Lastnosti zemlje in substratov oz. mešanic zemlje pred in po poskusu.....	41
5.1.2	Vpliv alternativnih metod razkuževanja na parametre rasti in rodnosti jagod ...	42
5.1.2.1	Intenzivnost rasti jagod .....	42
5.1.2.2	Rodnost jagod .....	44
5.1.3	Vpliv alternativnih metod razkuževanja tal na prisotnost plevelnih rastlin.....	46
5.1.4	Mikorizna in nemikorizna kolonizacija korenin jagod .....	47
5.1.4.1	Frekvenca mikorize (F%).....	47
5.1.4.2	Intenziteta mikorize (M%) in intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%) .....	49
5.1.4.3	Gostota arbuskulov (A%) in gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%).....	50
5.1.4.4	Delež rastlin z vezikli.....	51
5.1.4.5	Kolonizacija rastlin z DSE in nepoznanimi koreninskimi endofiti.....	52
5.1.5	Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za glomeromicete.....	54
5.1.5.1	PCR z začetnima oligonukleotidoma AM1 in NS31 .....	55
5.1.5.2	PCR z začetnima oligonukleotidoma MH2 in MH4.....	56
5.1.5.3	Pomnoževanje za TTGE .....	57
5.1.5.4	Analiza TTGE .....	57
5.1.6	Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi za regijo ITS.....	59
5.1.6.1	PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 1 f in ITS 4 .....	59
5.1.6.2	PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 4 in ITS 3 GC .....	60
5.1.6.3	Analiza TTGE .....	60
<b>5.2</b>	<b>Poljski poskus .....</b>	<b>62</b>
5.2.1	Vpliv alternativnih metod razkuževanja na parametre rasti in rodnosti jagod ...	62
5.2.1.1	Intenzivnost rasti jagod .....	62
5.2.1.2	Rodnost jagod .....	62
5.2.2	Vpliv alternativnih metod razkuževanja tal na prisotnost plevelnih rastlin.....	63
5.2.3	Mikorizna in nemikorizna kolonizacija korenin jagod .....	64
<b>5.3</b>	<b>Primerjava vplivov alternativnih metod razkuževanja na jagode .....</b>	<b>66</b>
5.3.1	Primerjava med lončnimi in poljskim poskusom.....	66
5.3.2	Primerjava vplivov alternativnih metod razkuževanja na merjene parametre....	67
5.3.3	Medsebojni vplivi merjenih parametrov .....	71
<b>6</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>72</b>
<b>6.1</b>	<b>Alternativne metode razkuževanja tal in založenost s hranili .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2</b>	<b>Vpliv alternativnih oblik razkuževanja tal na parametre rasti in rodnosti jagod .....</b>	<b>73</b>
6.2.1	Biofumigacija.....	73
6.2.2	Solarizacija.....	74
6.2.3	Inokulacija z AM glivami .....	75
<b>6.3</b>	<b>Zapleveljenost.....</b>	<b>77</b>
6.3.1	Biofumigacija in zapleveljenost.....	77
6.3.2	Solarizacija in zapleveljenost.....	78
<b>6.4</b>	<b>Mikorizna kolonizacija jagod in razkuževanje tal.....</b>	<b>78</b>
6.4.1	Vpliv biocidnih rastlin na mikorizno kolonizacijo .....	80
6.4.2	Vpliv solarizacije na mikorizno kolonizacijo .....	82
6.4.3	Vpliv dazometa na mikorizno kolonizacijo .....	84



<b>6.5</b>	<b>DSE in nepoznani koreninski endofiti ter alternativne metode razkuževanja tal .....</b>	<b>84</b>
<b>6.6</b>	<b>Molekulska identifikacija AM, DSE in koreninskih endofitov.....</b>	<b>85</b>
<b>6.7</b>	<b>Sklepi.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>96</b>
<b>ZAHVALA</b>		
<b>PRILOGE</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Obravnavanja in oznake obravnavanj v lončnih poskusih .....	23
Preglednica 2: Številka in izvor vzorca za molekulsko identifikacijo mikoriznih in DSE gliv oz. nepoznanih koreninskih endofitov .....	27
Preglednica 3: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z AM1 in NS31 .....	28
Preglednica 4: Parametri cikla za pomnoževanje DNA z AM1 in NS31 .....	29
Preglednica 5: Parametri cikla za pomnoževanje DNA z MH2 in MH4.....	29
Preglednica 6: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z NS31-GC in Glo1.....	30
Preglednica 7: Parametri cikla za pomnoževanje DNA - Glo1 .....	30
Preglednica 8: Izvor in številka vzorca za molekulsko identifikacijo mikoriznih gliv, DSE in nepoznanih koreninskih endofitov .....	34
Preglednica 9: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z ITS 1 f in ITS 4 .....	35
Preglednica 10: Parametri cikla za pomnoževanje DNA .....	35
Preglednica 11: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z ITS 4 in ITS 3 GC .....	36
Preglednica 12: Načini obdelave tal, obravnavanja v poljskem poskusu in oznake obravnavanj .....	38
Preglednica 13: Kemična analiza zemlje za substrate in analiza substratov iz LP II po zaključenem poskusu .....	41
Preglednica 14: Masa listov na rastlino v LP III .....	44
Preglednica 15: Število plodov na rastlino v LP III .....	46
Preglednica 16: Delež rastlin z vezikli v lončnih poskusih, 7 tednov po sajenju (%).....	52
Preglednica 17: Delež rastlin z DSE oz. nepoznanimi koreninskimi endofiti v lončnih poskusih, 7 tednov po sajenju (%).....	54
Preglednica 18: Oznaka vzorca in številka fragmenta izrezanega iz poliakrilamidnega gela ter oznaka klonov za sekvenciranje .....	58
Preglednica 19: Identifikacija sekvenc iz TTGE .....	59
Preglednica 20: Izvor vzorca in številka fragmenta izrezanega iz poliakrilamidnega gela. 60	
Preglednica 21: Identifikacija sekvenc DSE in nepoznanih koreninskih endofitov.....	61

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematska predstavitev pomnoževanja in PCR produktov z različnimi začetnimi oligonukleotidi.....	31
Slika 2:	Povprečna masa listov na rastlino v LP I (a) in LP II (b) .....	43
Slika 3:	Povprečno število plodov na rastlino v LP I (a) in LP II (b) .....	45
Slika 4:	Povprečno število plevelov na sadilno mesto v LP I in LP II.....	46
Slika 5:	Frekvenca mikorize (F%) v LP I (a) in LP II (b) .....	48
Slika 6:	Intenziteta mikorize (M%) v LP I (a) in LP II (b) in intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%) v LP I (c) in LP II (d) .....	49
Slika 7:	Gostota arbuskulov (A%) v LP I (a) in LP II (b) in gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%) v LP I (c) in LP II (d).....	51
Slika 8:	Tipi DSE oz. nepoznanih koreninskih endofitov .....	53
Slika 9:	Produkti PCR (AM1 in NS31) (dodan direktn produkt DNA) .....	55
Slika 10:	Produkti PCR (MH2 in MH4 ter AM1 in NS31).....	56
Slika 11:	Produkti vgnezdene PCR (AM1 in NS31).....	56
Slika 12:	TTGE profili in izsek elektroferograma vzorcev 6D, 5D, 4F in 3F.....	57
Slika 13:	Produkti PCR (ITS 1f in ITS 4) .....	60
Slika 14:	TTGE profili .....	61
Slika 15:	Povprečna masa pridelka na grm v prvem in drugem letu poljskega poskusa ...	63
Slika 16:	Število plevelov na sadilno mesto v poljskem poskusu.....	64
Slika 17:	Frekvenca mikorize (F%) v poljskem poskusu.....	65
Slika 18:	Povprečno število plodov na rastlino v vseh lončnih poskusih v primerjavi s sorodnimi obravnavanji v poljskem poskusu.....	66
Slika 19:	Vpliv alternativnih metod razkuževanja tal na rast in rodnost jagod, zaplevalejnost ter na AM in DSE kolonizacijo korenin jagod v inokuliranih in neinokuliranih obravnavanjih v primerjavi z inokulirano in neinokulirano kontrolo v treh lončnih poskusih.....	68
Slika 20:	Korelacija med številom plodov na rastlino in maso listov v LP I.....	69
Slika 21:	Korelacija med številom plodov na rastlino in frekvence mikorize (F%) v LP I.....	70
Slika 22:	Korelacija med številom plodov na rastlino in intenziteto mikorize (M%) v LP I.....	70
Slika 23:	Vpliv dostopnega P in K ter organske snovi in frekvence mikorize na število plodov in listno maso jagod v obravnavanjih brez mikoriznega inokuluma v LP II .....	71

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Analize glukozinolatov v biocidnih rastlinah v letih 2002 (poljski poskus) in 2003 (lončni poskusi) ( $\mu\text{mol/g ss}$ )
- PRILOGA B: Količina zaorane biomase in GSL v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami (poljski poskus - setev v letu 2002)
- PRILOGA C: Izračun mase rastlin in GSL dodanih substratom v lončnih poskusih (setev v letu 2003)
- PRILOGA D: Nihanja maksimalne temperature tal pod folijami
- PRILOGA E: Izračun mikorizne kolonizacije
- PRILOGA F: Mikorizna kolonizacija korenin jagod
- PRILOGA G: Nemikorizna kolonizacija korenin jagod (DSE ali nepoznani koreninski endofiti)
- PRILOGA H: Masa listov in število plodov na rastlino v LP I
- PRILOGA I: Masa listov in število plodov na rastlino v LP II
- PRILOGA J: Povprečno število plevelov na rastlino v lončnih poskusih
- PRILOGA K: Povprečno število živic in listov na rastlino v poljskem poskusu
- PRILOGA L: Povprečno število cvetov, masa pridelka in število plodov na rastlino ter povprečna masa plodu v prvem letu poljskega poskusa (2003)
- PRILOGA M: Povprečna masa pridelka v drugem letu poljskega poskusa (2004)
- PRILOGA N: Število plevelov na sadilno mesto v poljskem poskusu
- PRILOGA O: Mikorizna kolonizacija korenin jagod v LP I (%)
- PRILOGA P: Mikorizna kolonizacija korenin jagod v LP II (%)
- PRILOGA R: Mikorizna kolonizacija jagod v LP III (%)
- PRILOGA S: Mikorizna kolonizacija ter delež nemikoriznih mikrosklerocijev v vzorcih za molekulsko identifikacijo I (10 mesecev po sajenju) (%)
- PRILOGA T: Mikorizna kolonizacija ter delež nemikoriznih mikrosklerocijev v vzorcih za molekulsko identifikacijo II (%)
- PRILOGA U: Produkti PCR (ITS 4 in ITS 3)
- PRILOGA V: Mikorizna kolonizacija korenin jagod v poljskem poskusu (leto sajenja 2002) (%)
- PRILOGA Z: Delež rastlin z vezikli in mikrosklerociji DSE oz. neznanimi koreninskimi edofiti v vzorcu posameznega obravnavanja v poljskem poskusu (%)

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A%	gostota arbuskulov
a%	gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin
ALY	glukoalizin
AM	arbuskularna mikoriza
Bj	<i>Brassica juncea</i> – rjava gorjušica
D	dazomet
DSE	temni septirani endofiti (dark septate endophytes)
EKO	ekološka pridelava
Es	<i>Eruca sativa</i> – rukvica (rukola)
F%	frekvenca mikorize
GBN	glukobrasikanapin
GSL	glukozinolati
IP	integrirana pridelava
ITC	izotiocianat
K	kontrola
LP	lončni poskus
M%	intenziteta mikorize
m%	intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin
MB	metil bromid
MI	mikorizni inokulum
MITC	metilizotiocianat
MO	mikroorganizem
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
Sa	<i>Sinapis alba</i> – bela gorjušica
SIN	sinigrin
SOL	solarizacija
TTGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v temperaturnem gradientu (temporal temperature gradient gel electrophoresis)

## 1 UVOD

Pridelava jagod (*Fragaria x ananassa* Duch.) je razširjena na vseh celinah, vseh nadmorskih višinah, v različnih talnih tipih in v vsakršnih klimatskih razmerah. Med sadnimi rastlinami jagode pridelujemo po najbolj raznolikih tehnologijah, ki vključujejo gojenje največjega števila različnih sort. Pridelovanje je v primerjavi z drugimi sadnimi vrstami stabilno in ekonomsko uspešno. Skupna svetovna pridelava se stalno povečuje. Deleži posameznih pridelovalnih območji se spreminjajo. To je posledica ekonomskih razmer v posameznih državah, cene delovne sile, standarda potencialnih kupcev in izvoza. V letu 2011 smo jagode v svetu pridelovali na 244.283 ha površin, kar je v primerjavi z bolj razširjenimi sadnimi vrstami (oljke, citrusi, jabolane) malo. V Evropi pridelamo 65 % svetovne pridelave jagod (FAOSTAT). Delež pridelave jagod v Sloveniji je majhen, vendar za posamezne pridelovalce ekonomsko zelo pomemben (Koron in sod., 2010).

Tehnologije pridelovanja jagod razvrščamo na osnovi številnih kriterijev. Osnovna je razdelitev na konvencionalno, integrirano (IP) in ekološko (EKO) pridelavo. Na osnovi rastišča, delimo tehnologije na pridelavo v tleh (zemlja) in izven tal (v substratih). Na osnovi prostora na tehnologije pridelave na prostem in v zavarovanem prostoru. Tehnologije delimo še na osnovi večkratne ali enkratne rodnosti, časa zorenja, časa sajenja, načina trženja in na osnovi drugih kriterijev (Koron, 2011).

Vse dejavnosti kmetovanja so poseg v naravni prostor in v ravnovesje med posameznimi organizmi. Z vidika trajnostnega kmetovanja naj bi bilo spreminjanje naravnih razmerji čim manjše. Manj intenzivne tehnologije (ekološka) v prostor, predvsem v tla, vnašajo manj sprememb. Zaradi manjših pridelkov so kratkoročno ekonomsko manj zanimive, vendar dolgoročno za okolje predstavljajo veliko vrednost. Rizosfera je prostor, kjer se med rastlinami in talnimi organizmi vzpostavljajo najrazličnejši odnosi (živi dejavniki), od negativnih do pozitivnih. Rastline neposredno stopajo v stik z neživimi gradniki tal kot so talni delci, voda in zrak (neživi dejavniki). Rizosfera kmetijskih rastlin je prostor, v katerega človek najintenzivneje posega z različnimi tehnološkimi ukrepi (oranje, gnojenje, uporaba fitofarmaceutskih sredstev, namakanje, dreniranje) (Gianinazzi in sod., 2010; Baruzzi in sod., 2011). Uporaba kemičnih sredstev proti škodljivim organizmom (razkuževanje) je eden izmed ukrepov, s katerim v tleh ne uničimo le škodljivih, temveč tudi koristne organizme (Martin in Bull, 2002). S popolnim ali selektivnim uničenjem organizmov v tleh zrušimo ravnovesje.

Zaradi narave rasti je pridelovanje jagod od vseh sadnih vrst najbolj intenzivno. Nasad jagod izkoriščamo eno ali dve leti. Pogosto sajenje od pridelovalcev zahteva velike posege v tla. Za integrirano in ekološko pridelavo so potrebne velike površine, saj na ista tla lahko rastline ponovno sadimo vsako tretje, pri ekološki pridelavi pa vsako peto leto. Tako dolgo vmesno obdobje je pri jagodah potrebno zaradi enostranskega izčrpanja tal in zasičenosti tal z organizmi, ki povzročajo bolezni, škodljivci in pleveli (Chellemi, 2002). V tehnologijah iščemo ukrepe, s katerimi bi vmesno obdobje med zasaditvami iste kulture (jagoda) skrajšali in s tem pridelovalcem omogočili hitrejše vračanje na isto površino. Z novimi tehnologijami želimo zmanjšati uporabo kemičnih snovi (sredstva za varstvo rastlin, mineralna gnojila). Biofumigacija, solarizacija in drugi alternativni ukrepi zavirajo razvoj in delovanje škodljivih organizmov in ugodno vplivajo na pridelek, manj pa je

znano, kako ti ukrepi razkuževanja tal vplivajo na koristne organizme (Subbarov in Hubbard, 1996; Palermo in sod., 2012; Samtani in sod., 2012). Razkuževanje tal je namenjeno vzpostavljanju ugodnih rastnih pogojev za gojene rastline, vendar s temi ukrepi pogosto prizadenemo organizme, ki živijo v sožitju z njimi. Trajnostno naravnane tehnologije naj bi vključevale ukrepe, ki izkoriščajo dani potencial sobivanja koristnih talnih organizmov in rastlin, oziroma naj bi ga minimalno spreminjale ali celo izboljševale. V trajnostnem kmetijstvu naj bi bila arbuskularna mikoriza (AM) 'ekosistemski servis', ki bi zagotavljal kakovosten pridelek kmetijskih rastlin (Gianinazzi in sod., 2010). Z AM kolonizirane rastline sprejmejo več hranil, lažje premagujejo sušni stres in so bolj odporne na škodljive organizme (Demir in Akkopru, 2007).

Neposreden vpliv različnih tehnoloških ukrepov na razvoj mikoriznih gliv je možno ovrednotiti z različnimi konvencionalnimi ali molekuskimi tehnikami. Tehnike za ocenjevanje kolonizacije korenin z AM glivami, ki temeljijo na barvanju hif so dolgotrajne, zato se vse pogosteje uporabljajo molekulske tehnike. Med najbolj razširjenimi so verižna reakcija s polimerazo (PCR) in poliakrilamidna gelska elektroforeza v temperaturnem gradientu (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis - TTGE), s pomočjo katere lahko poleg prisotnosti mikoriznih gliv določamo tudi njihovo identiteto (Cornejo in sod., 2004). Razmerja med tradicionalnimi mikroskopskimi in molekuskimi tehnikami so nerazjasnjena in so predmet številnih raziskav (Omirou in sod., 2013, cit.po Thonar in sod., 2012).

Doktorska naloga je namenjena preučevanju vpliva dveh najbolj razširjenih alternativnih metod razkuževanja tal - solarizaciji in biofumigaciji. Z različnimi tehnikami smo želeli ovrednotiti pomen metod na nekatere žive in nežive dejavnike v območju rizosfere jagode ter njihov posreden vpliv na količino in kakovost pridelka v pridelavi v zavarovanem prostoru in na prostem, v slovenskih pedoklimatskih razmerah.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 Klasične tehnologije priprave tal

#### 2.1.1 Kolobarjenje

V Sloveniji jagode pridelujemo po pravilih integrirane in ekološke pridelave. Glavni dejavniki uspešne IP so zdrav sadilni material, ustrezen kolobar, optimalna uporaba sredstev za varstvo rastlin pred škodljivimi organizmi, gnojenje na osnovi analize tal ter dodajanje organske snovi (Martin in Bull, 2002). Do leta 2005 je bilo več kot tri četrtine svetovne pridelave jagod pridelanih z uporabo metil bromida (MB), v svetu najpogosteje uporabljenega sredstva za razkuževanje tal. V IP ima največjo vlogo varstvo rastlin pred škodljivimi organizmi. Rastline varujemo s pomočjo različnih tehnoloških ukrepov, dovoljenih kemičnih sredstev za zatiranje škodljivih organizmov (fitofarmacevtska sredstva) in koristnih organizmov. IP temelji na ravnovesju med koristnimi in škodljivimi organizmi. Največjo škodo v pridelavi jagod povzročajo koreninske bolezni. Škodljive talne glive so organizmi z dolgotrajno obstojnostjo. Odvisne so od zunanjih dejavnikov, ki vplivajo na čas in obseg škodljivega delovanja. Prisotnost gliv v tleh določamo na osnovi bolezenskih znamenj in na osnovi izolacije škodljivih gliv. Z molekulskimi tehnikami zelo hitro dobimo podatke o prisotnosti organizmov, ne dobimo pa obsega in potenciala razvoja bolezni. Populacije škodljivih gliv so najpogosteje za večino metod določanja pod mejo detekcije. Najboljši način obrambe pred škodljivimi organizmi je izogibanje optimalnim pogojem za njihov razvoj. Zato so se v pridelavi jagod razvile tehnologije pridelave izven tal (vreče ali lonci, napolnjeni s šotnim substratom) v rastlinjakih. Glavna načina izogibanja škodljivim organizmom v pridelavi na prostem sta kolobarjenje in minimalna obdelava (Chellemi, 2002). V pridelavi jagod so najbolj nevarne glive iz rodu *Phytophthora*, najbolj razširjene pa škodljive glive *Rhizoctonia* spp., ki v kompleksu z drugimi talnimi glivami (*Cylindrocarpon* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp.) povzročajo črno koreninsko gnilobo, enega izmed pomembnih razlogov za odmiranje nasadov jagod (Prits in Wilcox, 1990; Vrabl, 1992; Mass, 1998).

Poleg škodljivih mikroorganizmov (MO) v pridelovanju jagod velik problem predstavljajo pleveli. Ker je rast nizka, koreninski sistem pa plitev, jagode težko tekmujejo z višjimi in hitreje rastočimi plevelnimi rastlinami za svetlobo, hranila in vlago. Pleveli jagodam niso le konkurenti, ampak so pogosto gostiteljske rastline mnogih bolezni, ki okužujejo tudi jagode (Fennimore, 2008).

Z vrstjenjem različnih kultur v enem ali več rastnih obdobjih (kolobarjenjem) omejujemo razvoj koreninskih bolezni in plevelov ter povečujemo pridelek posameznih kultur. Med rastlinami, ki jih v svetu običajno uvrščajo v kolobar z namenom zatiranja plevelov in bolezni so rž, sirek, ozimna pšenica, ječmen, sončnica, gorjušica, ajda, sudanska trava in druge. (McGuire, 2003). V daljšem časovnem obdobju z nepravilnim kolobarjem naredimo veliko gospodarsko škodo, ki se izrazi šele takrat, ko kljub velikim vlaganjem v pridelavo ne dosegamo zadovoljivih pridelkov.

Osnovni namen kolobarja je v vzdrževanju rodovitnosti in strukture tal, optimalne vsebnosti dušika in humusa, imobilizaciji težko topnih hranil in njihovem sprejemanju iz



nižjih plasti, zmanjševanju izgube hranil z izpiranjem, preprečevanju in zmanjševanju erozije in ohranjanju vlage v tleh. Če pravil kolobarjenja ne upoštevamo in gojimo isto kulturo na isti parceli več let, se pojavi utrujenost tal, ki se izraža v vse manjši rasti rastlin, nizkem pridelku in pojavljanju bolezni in škodljivcev. Z uvajanjem fitofarmaceutskih sredstev in mineralnih gnojil je bilo omogočeno, da v kmetijski pridelavi pravil kolobarjenja niso več upoštevali (Znaor, 1996).

Klasično kolobarjenje je metoda oskrbovanja tal, s katero so se pridelovalci jagod ukvarjali poltretje stoletje. V Sloveniji je kolobar v pridelavi jagod le posledica naključne rabe določenih površin, ne pa premišljeno, načrtovano gospodarjenje z zemljo. Pri dosedanjem kolobarjenju z jagodami smo dali poudarek časovnemu ujemanju rasti posameznih kultur pred prednostmi kolobarjenja s posameznimi kulturami. Poudarek je bil na počitku tal, pri tem pa nismo upoštevali dejstev, da v obdobju, ko na določene površine ne sadimo jagod, lahko tla z določenimi ukrepi in rastlinami celo obogatimo ali izboljšamo. Rastline različno vplivajo na izčrpavanje tal. Nekatere humus razgrajujejo, druge so nevtralne ali pa ga izgrajujejo. V Sloveniji se pridelava jagod najbolj pogosto na isto parcelo vrača po dveh do treh letih. V tem obdobju zemljo zasejemo z ječmenom ali pšenico ter s travno deteljnimi mešanicami, ki so običajne kulture v kolobarju jagod. Pri ekološki pridelavi jagod predstavlja kolobarjenje, poleg sajenja odpornih sort in zdravega sadilnega materiala, glavno obrambo rastlin pred koreninskimi boleznimi (Martin in Bull, 2002). V nekaterih tujih tehnologijah EKO pridelave je sprejeto petletno kolobarjenje (Pritts in Kelly, 1993).

S poskusi in v praksi so ugotovili, da lahko pride ista kultura na isto mesto prej, če kolobar vključuje zeleno gnojenje (zeleni podor, podorine). Rastline za podor kot so facelija, oljna repica, gorjušica in druge, imajo pozitiven učinek na tla in kulturo, ki podoru sledi. Pridelovanje podorin ekonomsko ni zanimivo, saj pridelka po pridelovanju ne moremo neposredno tržiti, ampak s pridelavo podorin dolgoročno vplivamo na gospodarjenje na kmetiji. S setvijo podorin v jesenskem času preprečimo premeščanje hranil v globlje plasti tal in podtalnico (Kramberger, 2001; Zabret, 2002).

Kolobarjenje z biocidnimi rastlinami zavira rast gliv, škodljivcev in plevelov. Rastline iz kolobarja preko koreninskih izločkov ali ob razgradnji zaoranih ostankov ali celih rastlin, na druge organizme delujejo zaviralno. Biocidne rastline v kolobarju sejemo kot vrtnine (brokoli, brstični ohrovt), poljščine (oljna repica, bela gorjušica, ruska ogrščica ...) ali kot rastline za zeleno gnojenje.

V zadnjih desetletjih je zaradi problemov s tlemi vse pogostejše tudi sajenje jagod izven tal, v substrate. Priprava substratov je bolj preprosta od obdelave, vzdrževanja ali oživitve uničenih tal, saj kot substrat lahko uporabimo deviško zemljo ali različne organske substrate (humus, šota), kombinirane z raznimi sredstvi (perlit, vermikulit, lubje palme, steklena volna) (Stapleton in sod., 2002).

### **2.1.2 Zaporedno sajenje**

Uvedbo zaporednega sajenja jagod na isto površino je omogočilo kemično razkuževanje tal. Kemična spojina MB je bila ena izmed temeljev hitrega napredka v pridelavi jagod. V

Sloveniji razkuževanje tal z MB ni bilo nikoli dovoljeno. Za pridelavo jagod je bila dovoljena le uporaba nekaterih insekticidov in fungicidov, ne pa kemično razkuževanje tal.

Intenzivno pridelovanje jagod se je razvilo v ZDA, v Kaliforniji, v petdesetih letih prejšnjega stoletja. Osnova intenzivnega razvoja je bila uporaba brezvirusnega sadilnega materiala ter zatiranje škodljivih organizmov v tleh z razkuževanjem z MB. Glavni razlog uvajanja razkuževanja je bila potreba po zmanjšanju negativnih vplivov škodljivih gliv kot so *Verticillium dahliae* in *Phytophthora* spp. Škodo so sicer povzročale tudi glive iz rodov *Pythium*, *Rhizoctonia* in *Cylindrocarpon* (Martin in Bull, 2002). MB je vplival na širok spekter škodljivih organizmov: glive, ogorčice, insekte, pršice, glodalce, plevele in nekatere bakterije (Duniway, 2002). Uporaba MB v pridelavi je omogočila ne le večji pridelek, ampak je vzpodbudila žlahtnenje novih sort z izredno visokimi pridelki, ne glede na odpornost na bolezni (Porter in sod., 2006). V zgodnjih sedemdesetih letih so v pridelavo zelenjave in jagod uvedli nove tehnologije, ki so vključevale uporabo različnih folij, novih gnojil, novih metod nanašanja fitofarmaceutskih sredstev ter nove, bogato rodne sorte. Zaradi pomanjkanja pridelovalnih površin za nove načine pridelave in zaradi naraščanja materialnih stroškov takega načina pridelave, so pridelovalci začeli s podaljševanjem sezone pridelovanja in izrazito intenzivnim monokulturnim pridelovanjem (Chellemi, 2002). V monokulturi, četudi škodljivi organizmi niso prisotni, se pridelek jagod zmanjša (Razik in sod., 1989). Z intenziviranjem pridelave se je dodatno povečala pogostnost koreninskih bolezni, kar so poimenovali 'utrujenost tal' (old land syndrom) (Overman in sod., 1965) ali 'bolezni starih tal' (old land disease) (Bewick, 1989). Tudi v takih primerih so uvajali razkuževanje tal s sredstvi, ki delujejo na številne organizme. MB se je uporabljal v hortikulturnih sistemih z visokimi stroški, v katerih je strošek razkuževanja predstavljal majhen delež celotne naložbe, učinek pa je bil zelo velik (Duniway, 2002; Gullino in sod., 2005). Večina zemljišč je bila visokokakovostna in je zagotavljala neprekinjeno pridelavo visoko cenjenih pridelkov (paradižnik, jagoda, paprika, okrasne rastline, drevesnice, tobak). Analiza študij, v katerih so primerjali razkuževanje s standardno kombinacijo MB in kloropikrina je pokazala, da je v povprečju razkuževanje skoraj podvojilo pridelek jagod (Shaw in Larson, 1999), zato je bilo razumljivo zagovarjanje uporabe MB. Tudi rast rastlin, premer koreninskega vratu in korenin so bili na razkuženih tleh večji (Fort in Shaw, 1998; Hancock in sod., 2001).

Med doslej najučinkovitejšimi kemičnimi sredstvi za razkuževanje tal ostaja MB, saj je deloval na plevele, ogorčice in glive. Ko združimo lastnosti MB, med katerimi sta glavni nizka fitotoksičnost in dobro delovanje v vseh talnih razmerah vemo, zakaj so MB po letu 1960 pridelovalci sprejeli v skoraj vse tehnologije in je postal neizogibno potreben, kljub temu, da na vse škodljive organizme ni deloval (De Ceuster in Pauwels, 1995). Uporaba MB je bila del standardne tehnologije (Bartual in sod., 2002; Cebolla in sod., 2002). Martin in Bull (2002) sta trdila, da razkuževanje spremeni zastopanost MO tako, da se poveča število koristnih organizmov in zmanjša število škodljivih organizmov. Nekateri organizmi zaradi razkuževanja namreč še vedno preživijo. Trdila sta, da je pridelek jagod na razkuženih tleh večji tudi daljše obdobje po uporabi MB.

V letu 1991 so v stratosferi ugotovili veliko koncentracijo MB, ki je eden glavnih povzročiteljev tanjšanja ozonske plasti. Z montrealским protokolom in EC Regulativo 2037/2000 (Substances That Deplete the Ozone Layer) je bilo sklenjeno, da se z letom

2001 ukineta proizvodnja in uporaba MB v kmetijstvu, vendar so ukinitev predstavili na leto 2005, da bi podaljšali čas za iskanje alternativnih rešitev (Rieger in sod., 2001; Noling, 2002). Od kmetijskih kultur se je v svetovnem merilu največ MB uporabilo v pridelavi paradižnika (22 %) in jagod (13 %) (Gullino, 2002).

## **2.2 Alternativne tehnologije priprave tal**

### **2.2.1 Nova kemična sredstva za razkuževanje tal**

V zadnjih nekaj letih je bilo v svetu na jagodah opravljenih veliko raziskav o alternativnih metodah razkuževanja tal. Zaradi enostavne uporabe (aplikacije) in hitrega delovanja kemičnih sredstev, se je že pred prepovedjo uporabe MB z letom 2005, zelo veliko raziskovalcev usmerilo v iskanje novih kemičnih snovi in ne v iskanje novih, alternativnih tehnoloških ukrepov za zmanjševanje škodljivih talnih MO. Med pridelovalci je bila v obdobju prehajanja najbolj pogosta kombinacija MB in kloropikrina. Med novimi kemičnimi sredstvi, ki so jih pridelovalci najpogosteje preizkušali so bili: kloropikrin, 1,3 diklorpropen, metam-natrij, dazomet, metilizotiocianat (MITC), ogljikov disulfid, propilen oksid, metil jodid, propargil bromid, etandinitril, kalcijev cianamid, napropamid in drugo (Tosi in sod., 1994; Chellemi in sod., 1997; Davison in sod., 1999; Mark in Cassel, 1999; Shaw in Larson, 1999; Schreiner in sod., 2001; Cebolla in sod., 2002; Duniway, 2002; López-Aranda in sod., 2002; Noling, 2002; Ferguson in sod., 2003; López-Medina in sod., 2003; Ajwa in Trout, 2004; Benlioglu in sod., 2005; Kabir in sod., 2005; Mattner in sod., 2006; Medina in sod., 2006; Porter in sod., 2006; Zasada in sod., 2007; Fennimore in sod., 2008).

V raziskave so bile vključene tudi kombinacije manjših količin MB in solarizacije, MB in herbicidov ter uporaba VIF folij (virtually impermeable film), ki zmanjšujejo sproščanje MB v zrak (Bartual in sod., 2002; Noling, 2002; Gilreath, 2005). V Avstraliji so vse pogosteje uporabljali metam-natrij, ki ob stiku z vlago preide v MITC, ki je zelo podoben snovem, ki se sproščajo pri biofumigaciji (izotiocianati - ITC). Ob raziskovanju delovanja kemičnih snovi v tleh so ugotovili povečanje biodegradacije. To je pojav, ko fitofarmacevtska sredstva, ki so dodana zemlji vzpodbujajo rast MO ali se MO s fitofarmacevtskimi sredstvi celo hranijo. Razkroj kemikalij lahko postane tako hiter, da namen tretiranja sploh ni dosežen (Davison in sod., 1999).

V Sloveniji je za razkuževanje tal v kmetijstvu, vendar ne za jagode, dovoljen le dazomet (Basamid – BASF). Dazomet je mikrogranulirana snov za razkuževanje, ki deluje herbicidno, fungicidno, baktericidno, nematocidno in insekticidno. Delovanje je zelo podobno delovanju biocidnih rastlin (D'Anna, 2005). Ko ga vdelamo v vlažna tla se razgradi v številne hlapne snovi, predvsem na MITC. Večjo učinkovitost delovanja in večjo ekološko sprejemljivost dazometa dosežemo z uporabo folij. Pod folijo dosežemo višjo temperaturo, ki je potrebna za razgradnjo dazometa v MITC. S prekrivanjem tal po tretiranju se izognemo izhlapevanju MITC v zrak in pronicanju snovi v podtalnico. Učinek delovanja MITC pod folijo je večji zaradi podaljšanega delovanja v zemlji. S prekrivanjem dosežemo dodaten učinek solarizacije. Folija preprečuje izsuševanje tal, zato je pospešena tudi mineralizacija dazometa v rastlinam dostopna hranila. Razgradni produkti dazometa nimajo vpliva na stratosfero (Harris, 1991; Eitel, 1995; Mappes, 1995). Dazomet ni

registriran za uporabo za prehranske pridelke kot so jagode, ampak se ga lahko uporablja le v vzgoji sadik (BASF, 1997). V ZDA je registriran za drevesnice in ne za sadovnjake. Dazomet se uporablja tudi v kombinaciji z drugimi kemičnimi sredstvi, npr. z metam-natrijem, kar omogoča večjo in trajnejšo kontrolo škodljivih organizmov (Duniway, 2002).

## 2.2.2 Nekemični načini razkuževanja tal

Med alternativne, nekemične načine razkuževanja tal prištevamo solarizacijo, biofumigacijo, prekrivanje tal z neprozornimi folijami, dodajanje velikih količin organske snovi, uporabo antagonističnih mikroorganizmov in koristnih koreninskih bakterij iz rodov *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia pyrocinia* in dr., mikoriznih gliv (*Glomus* spp.) in drugih gliv (*Trichoderma* spp., *Muscador albus* in dr.) (Pritts in Kelly, 1993; Neri in sod., 1998; Landa in sod., 2001; Guillino in sod., 2002 in 2005; Rosati, 2002; Leandro in sod., 2007; McSpadden Gardener, 2007). Alternativne metode lahko med seboj tudi dopolnjujemo. Primernost metode je pogojena z različnimi dejavniki, vključno z infrastrukturo, klimo, trgom, prisotnostjo škodljivih organizmov, razpoložljivostjo zemljišč, stanjem zemljišč in tipom zemljišč. Soodvisnost teh dejavnikov vpliva na izbor najboljše metode (Guillino in sod., 2005). Od alternativnih metod sta v pridelavi jagod najbolj razširjeni solarizacija in biofumigacija (Gengotti in Lucchi, 2000).

### 2.2.2.1 Solarizacija

Postopek solarizacije so razvili v Izraelu v sredini osemdesetih let (Katan, 1976). Solarizacija je naravni hidrotermalni proces, pri katerem s pomočjo prozorne folije in sončnega sevanja tla segrevamo. Deluje kot kombinacija fizikalnih, kemičnih in bioloških procesov v tleh. Plastična folija kratkovalovnim sončnim žarkom omogoča, da prodrejo do tal, preprečuje pa izhajanje dolgovalovnim žarkom, kar se izraža v dvigu temperature tal. Povečana toplota v tleh, ki naj bi trajala vsaj od 6 do 8 tednov, vpliva na razvoj mnogih talnih organizmov. Uspeh ukrepa solarizacije je odvisen od vremenskih razmer, tipa tal, vlage in populacije talnih MO. Povečana toplota tal zmanjšuje populacijo plevelov in rastlinskih škodljivih organizmov, vključno z glivami, bakterijami in ogorčicami (Bringinghurst in sod., 1997; Chellemi in sod., 1997; Palumbo in sod., 1999a; Ioannou N. in Ioannou M., 2002; Pinkerton, 2002; Saremi in sod., 2010). Uspeh solarizacije temelji na dejstvu, da večina škodljivih organizmov ne more preživeti daljšega obdobja na temperaturi nad 37 °C. Občutljivost je povezana s prepustnostjo celičnih membran, ki pri višjih temperaturah ne morejo delovati, če so onemogočeni encimski procesi, predvsem tisti, ki so povezani z dihanjem (Stapleton in DeVay, 1984).

Uporaba solarizacije je razširjena med pridelovalci kmetijskih kultur v rastlinjakih in na majhnih odprtih površinah. Primerna je predvsem za toplo, aridno klimo, vendar delno deluje tudi v humidni klimi, kjer je manj sončnega sevanja. Čeprav se tla segrevajo tudi pod črno folijo, večina študij nakazuje na boljše rezultate pod prozorno folijo (Chase in sod., 1999). Učinek na hladnejših in bolj vlažnih območjih je manjši. Za bolj hladna območja je solarizacija primerna v povezavi z drugimi alternativnimi metodami (Katan, 1983). Su in sod. (2007) menijo, da je solarizacija potencialni sanitarni ukrep v matičnih nasadih jagod ter v ekološki in konvencionalni pridelavi. Za pridelovalce zelenjave je solarizacija ekonomsko vprašljiva, saj poteka v poletnem času, zaradi česar prihaja do

izpada pridelka in s tem dohodka (Schreiner in sod., 2001). V tehnologijah pridelave jagod se solarizacija časovno optimalno pokriva z zaključkom obiranja in s poletnim sajenjem.

Solarizacijo izvedemo tako, da tla predhodno obdelamo in jih nato prekrijemo s prozorno folijo. Pod folijo tla lahko namakamo in s tem povečamo učinek toplote (Baruzzi in sod., 1997; Palumbo in sod., 1999a; Gilreath in sod., 2005) ali pa ne namakamo (Shlevin in sod., 2005). Učinek solarizacije lahko močno povečamo, če tla oblikujemo v grebene (Chellemi, 1997) ali solarizacijo izvajamo v tunelu (Palumbo in sod., 1999b; Shlevin in sod., 2004; Shlevin in sod., 2005). S solarizacijo tla segrejejo od približno 15 do 20 cm globoko. Največ škodljivih gliv živi do globine 20 cm (Lazzeri in sod., 1999).

Učinek razkuževanja tal s solarizacijo se izrazi v zmanjšanem številu škodljivih gliv v tleh. Solarizirana tla so za razvoj določenih organizmov bolj neugodna kot nesolarizirana. Spremembe v talni mikroflori zaradi solarizacije vplivajo na večjo rast in rodnost gojenih rastlin (Stapleton in DeVay, 1984; Greenberg in sod., 1987). Katan in sod. (1983) so ugotovili, da se koristni MO kot so npr. bakterije, ki tvorijo antibiotike ter fluorescenčne bakterije iz rodu *Pseudomonas*, ki se nahajajo v vodi, zemlji, na rastlinah in ljudeh, v solariziranih tleh bolje razvijejo kot škodljive glive. Nekatere študije, ki jih je opravila Katanova raziskovalna skupina so potrdile, da so antagonistične glive iz rodov *Trichoderma* in *Talaromyces* ter saprofitna gliva *Fusarium* spp. po solarizaciji bolj uspešne pri poseljevanju tal kot škodljive glive. Pullman in sod. (1981) so v svojih poskusih dokazali, da med uničenjem škodljivih organizmov in trajanjem solarizacije ter višino temperature tal obstaja logaritemska povezava. Solarizacija vpliva na delno zmanjšanje populacije, vendar večina gliv iz rodu *Trichoderma* solarizacijo preživi (Katan in sod., 1983; Porras in sod., 2007). Ugotovili so, da je bila frekvenca izoliranih škodljivih gliv značilno manjša na solariziranih tleh, medtem ko se frekvenca saprofitne glive *Fusarium* sp., in DSE gliv (temni septirani endofiti) s solarizacijo ni značilno zmanjšala. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Greenberg in sod. (1987) ter Saremi in sod. (2010).

Vpliv solarizacije je lahko zelo velik in dosega, včasih pa celo presega delovanje kemičnega razkuževanja tal z MB (Chellemi in sod., 1997; Schreiner in sod., 2001; Prinzivalli in sod., 2001). Kljub temu, da so doseženi rezultati dobri, s solarizacijo ne uničimo vseh škodljivih organizmov, saj v naravnem okolju zelo hitro prihaja do rekolonizacije talnih MO in ogorčic.

S kombinacijo zelenega gnojenja in solarizacije lahko močno zmanjšamo število talnih škodljivih organizmov. Visoka temperatura vzpodbuja razkroj organske snovi, kar poveča sproščanje strupenih hlapnih snovi, ki se ujamejo pod plastično folijo in tako daljše obdobje delujejo v tleh (Tsrer in sod., 2007).

Solarizacija ne vpliva le na škodljive organizme, ampak tudi na koristne mikorizne glive (Mishra in sod., 2002). V primerjavi s kontrolo se je v tleh zmanjšalo število spor mikoriznih gliv, kar se je neposredno odražalo tudi na manjšem pridelku. Obratno pa sta Stapleton in DeVay (1984) ugotovila, da se kolonizacija korenin breskev z AM po solarizaciji ni zmanjšala.

### 2.2.2.2 Biofumigacija

Biofumigacija je tehnološki ukrep zelenega gnojenja z biocidnimi rastlinami, v katerem se v tla iz zaoranih križnic sproščajo snovi, ki zavirajo ali preprečujejo razvoj talnih organizmov. Izraz biofumigacija je leta 1993 prvič uporabil J.A. Kirkegaard. Že okrog leta 1930 so v laboratorijih ugotovili fungicidno delovanje olja gorjušice na škodljive glive, pozneje pa so dokazali tudi vpliv glukozinolatov na ogorčice (Subbarov in Hubbard, 1996). Rastline iz družine križnic vsebujejo glukozinolate, ki se po hidrolizi spremenijo v strupeno delujoče izotiocianate. Biofumigacija predstavlja tehnološki ukrep kolobarjenja s križnicami, čeprav so v preizkušnji in praksi tudi druge rastline, kot npr. grašica (*Vicia villosa*) (Nehl, 1999). Biofumigacija temelji na alelopatiji, ki je kemično onemogočanje ene vrste rastlin do drugih (Chew, 1999; McGuire, 2001; Matthiessen in Kirkegaard, 2006). Alelopatijo lahko definiramo kot mehanizem rastlinske navzkrižnosti, pri katerem rastline svoje sekundarne snovi izločajo v rizosfero z razkrojem ostankov, izhlapevanjem ali izločki korenin (organske kisline, antibiotiki, baze, alkaloidi, glikozidi). Alelopatija je prisotna pri vseh vrstah rastlin in pri vseh tipih tkiv. Alelokemične snovi so zelo različne. Opisana je bila že v času Rimljanov, izraz pa je prvič uvedel Molisch leta 1937 in ga označil kot vzajemno delovanje med rastlinami. S poznavanjem alelopatijskih odnosov lahko v rastlinski pridelavi razrešimo nekatere praktične probleme, ki temeljijo na odnosu med posameznimi rastlinami. Rastlinsko navzkrižje je lahko definirano kot katerikoli fizikalni ali kemični mehanizem, ki se po določenem času odraža v zmanjšani rasti rastlin zaradi prisotnosti drugih rastlin. Tekmovanje je ponavadi izraženo kot proces, kjer rastline ovirajo rast sosednjih rastlin z uporabo prehranskih virov, prostora, svetlobe, vlage ali z izločanjem strupenih snovi. Hiter učinek alelopatije je viden kot zaviranje ali upočasnjevanje kaljenja, preprečevanje izdolževanja in debeljenja korenin, nekroze na koreninskih vršičkih, sukanje koreninske osi, razbarvanje, pomanjkanje koreninskih laskov in dr. (An in sod., 1998). Poznavanje alelopatijskih lastnosti v kmetijstvu izkoriščamo predvsem za zatiranje plevelov. Rastline uvrstimo v kolobar kot vmesno kulturo ali kot pokrovno rastlino. Pri pokrovnih posevkih ni pomembna le fizična prisotnost rastlin, ki zavirajo razvoj plevelov, ampak tudi kemični učinek fitotoksinov, ki se izločajo iz rastlin. V preteklosti so preučevali predvsem alelopatije, ki so imele škodljiv vpliv rastlin ali njihovih ostankov na pridelek. V kmetijski pridelavi poseben problem predstavlja ponovno sajenje iste kulture na isto mesto. Povezano je s strupenostjo ostankov enoletnih in trajnih rastlin. Alelopatijo, pri kateri izločki iz rastline zavirajo rast iste rastline imenujemo avtotoksičnost, alelopatijo, pri kateri pa je zavirana rast drugih rastlin v neposredni bližini, pa heterotoksičnost (Rice, 1984). Avtotoksičnost pri jagodah, zaradi obstoječih tehnologij, ki temeljijo na večletnem sajenju na isti lokaciji, predstavlja velik problem (Kitazawa in sod., 2005; Asao in sod., 2008). V kmetijski pridelavi so najbolj znane alelopatije oreha, lucerne, šparglja in sirka. Izločki korenin imajo pomemben vpliv na ekologijo rizosfere, vključno s porastom ali zmanjšanjem določene populacije MO. To vodi v spremembo razpoložljivih hranil in njihovega sprejemanja znotraj ekosistema (Lazzeri in Manici, 2001; Weston, 2005).

Biofumigacija je alternativna metoda z izrazito kratkim kolobarjem, ki poleg vpliva na škodljive talne organizme in plevela, po zaoravanju v tleh povečuje organsko snov (Smith in sod., 2004). Z vnašanjem listne mase biocidnih rastlin ali moke iz semen biocidnih rastlin v tleh povečujemo količine organske snovi, preprečujemo erozijo in vplivamo na

zmanjšanje populacij škodljivih gliv in ogorčic, povzročiteljic odmiranja rastlin. Različne križnice različno vplivajo na zmanjšanje populacij škodljivih gliv (Kirkegaard, 1996; Charron in Sams, 1999; Gengotti, 2001; Bates in Rothrock, 2006).

Postopek zaoravanja biocidnih rastlin je za uspeh biofumigacije zelo pomemben. Kirkegaard (2001) in Matthiessen (2002) sta v poskusih na prostem in v laboratoriju ugotovila, da je za uspešnost biofumigacije poglavitni razkroj rastlinskega tkiva na nivoju celice. Z zamrzovanjem in odtajanjem se vsebnost izločenega izotiocianata poveča v povprečju za 400 krat. Vpliv na izločanje ITC ima tudi vlaga, saj se v vlažnih tleh izločanje podvoji. Priporočljivo je, da tla po zaoravanju križnic navlažimo (Curto in sod., 2006). Učinek delovanja križnic povečamo tudi s tem, da zeleno maso zmeljemo (zmaceriramo, zmulčimo), zaorjemo, obdelano površino navlažimo in prekrijemo s folijo (solarizacija) (Kirkegaard, 2004; Curto in sod., 2006). Biocidne rastline zaoravamo pred cvetenjem, ko je koncentracija glukozinolatov (GSL) največja in ko rastline še ne semenijo. Kaleče biocidne rastline bi lahko sledeči kulturi, kot plevelne rastline, predstavljale velik problem (Lazzeri in sod., 2009). Za doseganje najboljšega učinka biofumigacije mora biti temperatura tal med 10 in 15 °C. Zaradi strupenega delovanja biocidnih rastlin glavno kulturo sadimo od 7 do 10 dni po zaoravanju biocidnih rastlin (Curto in sod., 2006; Lazzeri in sod., 2009). Življenjska doba produktov GSL je kratka. ITC ostanejo v zemlji od nekaj dni do nekaj tednov. Biološko delovanje ITC je kratko predvsem na nepokritih površinah (Brown in Morra, 2005). Mattner in sod. (2008) so ugotovili, da učinek biocidnih rastlin na škodljive glive s časom močno upade. Največji je približno 4 ure po zaoravanju.

Dejavnik, ki najbolj zavira biološko aktivnost GSL so tla, predvsem tista z visoko vsebnostjo organske snovi. V primerjavi z *in vitro* kulturo je v peščeni ali ilovnati zemlji za enako delovanje na MO potrebno od 10 do 20 krat več MITC, v šotnih tleh pa celo od 25 do 50 krat več. V peščenih tleh z nizko vsebnostjo organske snovi je bifumigacijski učinek mnogo večji (Matthiessen in Shackelton, 2005). Gardiner in sod. (1999) trdijo, da je učinek biofumigacije na polju v primerjavi z laboratorijskimi poskusi izkoriščen le 5%. Do podobnih rezultatov je prišel tudi Kirkegaard (2001), ki je ugotovil, da se v tla ob standardni udelavi sprosti manj kot 5 % ITC in da je največja vsebnost ITC v zemlji 2 uri po zaoravanju. Kljub temu raziskave kažejo, da je biofumigacija ena najbolj učinkovitih alternativnih metod razkuževanja tal. Delovanje biocidnih rastlin povečamo v kombinaciji s solarizacijo ali npr. z dodajanjem antagonističnih MO (npr. *Trichoderma harzianum*) (Harvey in sod., 2002; Kirkegaard, 2001).

#### **2.2.2.2.1 Biocidne rastline**

Za biofumigacijo so najbolj primerne rastline iz družine križnic. To so rjava gorjušica (*Brassica juncea*), rukvica ali rukola (*Eruca sativa*), redkvica (*Raphanus sativus*), bela gorjušica (*Sinapis alba*), navadna ogrščica (*Brassica napus*), grbasta repnica (*Rapistrum rugosum*), strniščna repa (*Brassica rapa*), brokoli (*Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *cymosa*), obrečni grenik (*Iberis amara*) in dr. Najbolj pogosto uporabljene rastline izven družine križnic so *Crambe abyssinica*, pajkovka (*Cleoma hassleriana*), sončnica (*Helianthus annuus*) in žametnica (*Tagetes* spp.) (Subbarao in Hubbard, 1996; Chellemi, 1997; Reynolds in sod., 2000; Arcuti in sod., 2001; Harding, 2001; Harvey in sod., 2002; Lopez-Aranda in sod., 2002; Lazzeri in sod., 2009; Snyder in sod., 2009). Nekatero izmed

rastlin npr. rukvica in redkvica se ne uporabljata le kot rastlini za biofumigacijo, ampak tudi kot rastlinske lovilne pasti (catch crops) za ogorčice (Curto in sod., 2006).

Vse rastline iz družine križnic niso primerne za biofumigacijo. Mayton in sod. (1996) so ugotovili, da imajo posamezne vrste križnic in tipi oz. sorte znotraj vrst na škodljive glive zelo različen vpliv. Njihov učinek je lahko popoln ali nič. Različne sorte znotraj vrst *B. napus*, *B. carinata* in *B. campestris* vsebujejo nič ali zelo malo GSL in zato na glive nimajo nikakršnega učinka. S poskusi so ugotovili, da so glive v zemlji bolj občutljive na strupene snovi kot v rastnem mediju v laboratoriju. Za uspešno biofumigacijo so potrebna posebna križanja in selekcije, kajti vse biocidne rastline niso primerne za vsa okolja in vse tipe tal (Rosati, 2002).

V posameznih žlahtniteljskih ustanovah so za namene biofumigacije izvedli križanja in selekcije sort z večjo vsebnostjo GSL (Lazzeri in Manici, 2001; Light, 2001; Bryant, 2003; Lazzeri in sod., 2009). Ukvarjajo se s selekcioniranjem na večjo maso križnic ter na tip in koncentracijo GSL v poganjkih in koreninah. Količina skupnih GSL običajno zelo niha. Korenine v povprečju k skupnim GSL prispevajo eno četrtno. Tip GSL niha med rastlinskimi vrstami, vendar GSL znotraj vrste ostajajo enaki. Poganjki vsebujejo predvsem alifatske, korenine pa aromatske GSL (Matthiessen in Kirkegaard, 2006). Razlike so velike tudi glede na način pridelave, temperaturo in intenziteto svetlobe (pridelava na prostem, rastlinjak) (Charron in Sams, 2004; Kang in sod., 2006).

Rastline vsebujejo največje količine GSL v času cvetenja ali tik pred njim. Ob biofumigaciji je sproščanje GSL zelo različno. Gorjušica ima npr. 5 krat večjo vsebnost GSL v rastlinskem tkivu kot druge križnice, vendar je vsebnost ITC v zemlji samo 2 krat večja. Rezultati so pokazali, da je glavni omejitveni dejavnik biofumigacije potencial sproščanja ITC iz tkiva, zato je potrebno iskati metode, ki bi povečale razkroj celic in hidrolizo GSL v ITC (Kirkegaard, 2001; Matthiessen, 2002).

Rjava gorjušica se uporablja tudi v postopku fitoekstrakcije oz. rizofiltracije. To je postopek razstrupljanja naravnega ali umetnega vodnega okolja rastlin s pomočjo dejavnosti celih rastlin oz. korenin. Za čiščenje onesnaženih voda so uporabne tako vodne kot nekatere kopenske rastline. Med kopenskimi rastlinami se poleg rjave gorjušice uporablja tudi sončnica (Dolinšek, 2007).

#### **2.2.2.2.2 Glukozinolati**

Glukozinolati so v bližnji preteklosti preučevali predvsem zaradi negativnega vpliva krme iz križnic na zdravje živali. Danes se vse bolj zavedamo dejstva, da so mnoge od teh snovi inhibitorji razvoja rakavih celic pri sesalcih. GSL so prisotni v 16 rastlinskih družinah. Večina jih je v rastlinah iz družine križnic (Angus in sod., 1994; Bending in Lincoln, 1999; Fahey in sod., 2001).

GSL so sekundarne dušične in žveplave snovi, ki vsebujejo ostanek sladkorja  $\beta$ -D-glukopiranoze. Preko žvepla so povezane s hidroksiimino sulfatnim estrom in s stransko verigo, ki se razlikuje od spojine do spojine. V križnicah je znanih okoli 120 GSL. V eni rastlini je lahko tudi do 15 različnih GLS. Najdemo jih v vseh delih rastlin. Pogosto so



deleži posameznih spojin v delih rastlin različni. Nahajajo se v vakuolah rastlinskih celic. Ob poškodbah celic (mulčenje) so GSL izpostavljeni encimu mirozinaza (tioglukozid glukohidrolaza), ki ob prisotnosti vode katalizira reakcije hidrolize GSL do nastanka ITC, sulfidov, tiocianatov, epitionitrilov in nitrilov, ki imajo fungicidne lastnosti. Vsi GSL, razen progoitrina, ki povzroča golšavost in je prisoten npr. v semenu navadne ogrščice, so pomembni pri razstrupitvi človekovega organizma in zaščiti pred oksidativnim stresom (Subbarao in Hubbard, 1996; Curto in sod., 2006; Ugrinović, 2006). Glukozinolati so razdeljeni v alifatske, aromatske in indolilne spojine. ITC sproščajo samo alifatski in aromatski GSL (Fahey in sod, 2001). GSL niso biološko aktivni, vendar so prekursorji za potencialne alelokemične snovi. Tipi GSL so med vrstami rastlin različni. ITC so največji inhibitorji mikrobnih aktivnosti. Čeprav so GSL inhibitorji za mnoge organizme, vdolana organska snov istočasno v tleh pospešuje mikrobnjo populacijo zaradi povečane količine ogljika (Brown in Morra, 2005). ITC, ki se izločajo iz križnic, so podobni aktivnim snovem sintetičnih fumigantov, kot so metam-natrij, metam-kalij in dazomet (Mattner in sod., 2008). Metam-natrij in dazomet se v tleh razgradita na MITC (Schreiner in sod., 2001).

### 2.2.3 Druga alternativna sredstva za razkuževanje tal

Vnašanje komposta v tla je ena izmed alternativ kontrolne škodljivih organizmov v tleh. Kompost vpliva na večjo rast rastlin in na zmanjšanje prisotnosti rastlinskih škodljivih organizmov zaradi vnašanja koristnih mikrobnih organizmov (Benlioglu in sod., 2005; Lopez-Martinez in sod., 2006). Dokazano je, da se z vnosom humusa spremeni sestava tal v primerjavi s kemično razkuženimi tlemi. Poveča se koncentracija K, Mg in Ca. Pri P, Na, Mn, Zn in Cu (Leandro in sod., 2007). Med vedno bolj razširjene alternativne načine razkuževanja tal, oz. ohranjanja ravnovesja med talnimi organizmi sodi tudi dodajanje koristnih MO. Opravljenih je bilo veliko poskusov o vplivu posameznih vrst bakterij, gliv in mikoriznih gliv na škodljive mikroorganizme v tleh in s tem posredno na rast in razvoj gojenih rastlin (Rotenberg in sod., 2007). Poskuse z mikoriznimi glivami, antagonističnimi bakterijami (npr. *Pseudomonas fluorescens*, *Raoultella terrigena*, *Bacillus amyloliquefaciens*) in glivami *Trichoderma* spp. so na jagodah izvajali mnogi raziskovalci (Duncan, 2002; Leandro in sod., 2007; Merchier in sod., 2007).

Zaradi nujnosti stalnega odstranjevanja plevelnih rastlin so se razvile tehnologije gojenja jagod na foliji in v substratih izven tal. Zatiranje plevelov v nasadih brez folije je mogoče le s herbicidi ali s stalnim okopavanjem. V jagodah so se v preteklosti uporabljali številni selektivni herbicidi. V sodobnih tehnologijah se v pasu med rastlinami, razen v pridelavi sadilnega materiala, herbicidi ne uporabljajo. Dovoljena je le uporaba herbicidov v medvrstnem prostoru na prostem. V ekološki pridelavi uporaba herbicidov ni dovoljena, zato je uporaba folij, ki prekrivajo več vrst skupaj in uporaba alternativnih sredstev za zatiranje plevelov nujna. Barve folij imajo na rast plevelov različen vpliv. Na prostem je učinkovitost črne folije največja. Obenem folija vpliva tudi na pridelek, ki je zaradi segrevanja tal največji pri prozorni foliji (Johnsone in Fennimore, 2005). Plevela zatiramo tudi s pokrovnimi rastlinami, ki morajo biti hitro rastoče in v drugem letu ne smejo izraščati kot plevelne rastline. Dobro morajo zadrževati vlago in organsko snov ter zmanjševati populacijo škodljivih organizmov. Med take rastline sodijo križnice, proso, rž, sudanska trava in stročnice kot so grašica, detelja in kitajski fižol ter križanci stročnic

(Chellemi, 2002; Steffek in sod., 2006). Snovi, ki delujejo kot herbicidi, so še virusi, bakterije, glive in AM glive, ki selektivno uničijo določeno plevelno rastlino. Med pomembnimi sredstvi za zatiranje plevelov sta koruzni gluten in koruzni gluten hidrolizat (Christians, 2001; Dilley in sod., 2002; Rinaudo in sod., 2010).

Za večji učinek novih tehnoloških rešitev je potrebno žlahtniti in selekcionirati nove sorte jagod, ki bi bile odporne na talne škodljive glive in s tem primerne tudi za nerazkužena tla (Gengotti, 2001; Faedi in sod., 2002). Shaw in Larson (2001) sta s poskusi na razkuženih in nerazkuženih tleh želela ugotoviti povezavo med genotipi različnih sort jagod ter odpornostjo na koreninske bolezni, vendar do statistično značilnih rezultatov v večletnih poskusih nista prišla.

### **2.3 Odziv rastlin in MO v tleh na alternativne metode razkuževanja tal**

Tla so prostor, kjer se najbolj intenzivno prepletajo mineralne in organske snovi, ki so del zemlje ter voda, zrak in živi organizmi. Organizme predstavljajo rastlinski deli, ki segajo v tla ter makro in mikroorganizmi, ki so jim tla občasen ali stalen življenjski prostor. Med vsemi deli tega prostora so vzpostavljene tesne povezave, ki dejansko predstavljajo življenje v tem okolju. Poznavanje odnosov med gradniki tega prostora je temeljno vodilo za razvoj optimalnih tehnologij pridelovanja posameznih kmetijskih kultur. V kmetijski pridelavi imajo eno izmed bistvenih vlog prav razmerja med posameznimi vrstami bakterij, gliv in mikoriznih gliv ter škodljivimi mikroorganizmi v tleh. Ta razmerja posredno ali neposredno vplivajo na rast in razvoj gojenih rastlin (Rotenberg in sod., 2007).

#### **2.3.1 Mikoriza**

Mikoriza je mutualistična združba med koreninami rastlin in glivami. Mikorizne glive so prisotne povsod in tvorijo simbiotski odnos z večino rastlin. Skupine gliv tvorijo številne morfološke tipe mikoriznih združenj. Arbuskularna mikoriza je najpogostejša oblika simbioze. Tvori se v koreninah gostiteljskih rastlin z neseptiranimi, obligatno simbiotskimi glivami. Glive pripadajo deblu *Glomeromycota* (Schüßler in sod., 2001, Stürmer, 2012). Ker v celicah korenin tvorijo arbuskule in vezikle, mikorizno združbo imenujemo arbuskularna mikoriza. Vse AM glive imajo širok spekter gostiteljev na račun nespecifičnosti do gostitelja. Zato je ob dejstvu, da se razširja z nespolnimi sporami v tleh, ta tip tudi najbolj razširjen. AM se pojavlja pri kritosemenkah in golosemenkah, praprotnicah in gametofitih nekaterih mahov in je po nekaterih podatkih prisotna pri 80 % višjih rastlin (Molina in sod., 1992; Smith in Read, 1997). Dolga, nespolna evolucija se je izrazila v pomembnih genetskih različnostih med vrstami, ki se tudi morfološko razlikujejo. V kmetijskih sistemih z enoletnimi pridelki, preoravanje zemlje in s tem koreninskega sistema vsako leto zahteva kaljenje vedno novih mikoriznih spor, zato so obstale le glive, ki so se takim sistemom kmetijske pridelave prilagodile (Rosendahl, 2008).

V rizosferi poteka sodelovanje med koreninami rastlin in MO ter sodelovanje med posameznimi MO. Odnosi so lahko koristni (sinergistični), nevtralni ali škodljivi (antagonistični). Mikorizne glive v rizosferi predstavljajo populacijo, ki ima na rastline in tla več vplivov, kot sta npr. povečan sprejem hranil v rastlino in varstvo rastlin pred

stresnimi dejavniki okolja in obdelave. Vse te funkcije izboljšujejo strukturo tal (Smith in Read, 1997). Hife AM prodrejo v celice zunanega sloja skorje in v rastlini tvorijo arbuskule in vezikle. Arbuskuli so strukture, skozi katere poteka pretok ogljika do gliv ter hranila in voda do gostiteljske rastline. Vezikli so strukture za skladiščenje snovi. AM ima pomembno vlogo pri sprejemanju hranil, predvsem P, lahko pa rastlini nudi varstvo pred koreninskimi škodljivimi glivami. AM glive pozitivno vplivajo na koreninski sistem in celotno rastlino, na povečan sprejem hranilnih snovi (slabo mobilnih ionov), na tvorbo fitohormonov (citokinini, gibberelini in etilen), povečajo toleranco na žive in nežive stresne dejavnike (škodljivi organizmi, suša, slanost, šok ob presajanju, težke kovine), vplivajo na povečano sinergijo med koristnimi MO, kot na primer fiksatorji dušika in razgrajevalci fosfornih spojin. Sprejemna površina z glivami koloniziranih korenin oz. volumen tal iz katerega lahko glive sprejemajo hranila, se močno poveča (Azcón-Aguilar in Barea, 1996; Scagel, 2003). Zaradi povečane fotosinteze se v rastlini poveča delež ogljika. Ena največjih sprememb je v zmanjšanju prepustnosti membran zaradi povečane količine P. V okoljih, onesnaženih s težkimi kovinami, AM vpliva na manjši sprejem cinka (Zn) in kadmija (Cd) ter na spremembo sprejemanja svinca (Pb) (Pongrac, 2004). Po drugih virih AM vpliva na povečan sprejem Ca, Cu, Mn, S in Zn. Toleranco gostitelja za škodljive organizme poveča tudi z večjim sprejemom drugih esencialnih hranil, ne samo P. Mikorizne glive so v tleh prisotne kot spore ali vegetativni propaguli, ki se na koreninske izločke odzovejo z rastjo hif, ki prodrejo v epidermalne celice korenin. Mikoriza vpliva na morfološke in fiziološke spremembe v rastlini. Te so odvisne od tipa mikorize (Linderman, 1988). Hife se razraščajo v celicah zunanega korteksa korenin in tvorijo kolonije. Po tipu razrasti razlikujemo *Arum* tip (podolžna rast hif med gostiteljskimi celicami) in *Paris* tip AM (tvorba svitkov znotraj gostiteljskih celic) (Smith FA in Smith SE, 1997).

### 2.3.1.1 Arbuskularna mikoriza pri jagodah

Jagode so običajno kolonizirane z AM glivami. V nasadih so najpogosteje zastopane glive *Glomus mosseae*, *G. claroideum*, *G. clarum*, *G. hoi*, *G. geosporum* in *G. scintillans*. Kolonizirane rastline so na zunanje žive in nežive dejavnike bolj odporne, kljub temu, da je simbioza med rastlino in glivo izredno občutljiva na stres. Na mikoriznost jagod imajo velik vpliv dejavniki, na katere nimamo vpliva (letni čas, faza rasti rastline) (Branzanti in sod., 2002) in dejavniki, ki jih lahko reguliramo z odbiro (sorta, tip tal) (Duncan, 2002; Malusa in sod., 2006) ali ustvarimo z različnimi tehnološkimi ukrepi (gnojenje, uporaba sredstev za varstvo rastlin) (Sharma in Adholeya, 1994; Branzanti in sod., 1998, 2002; Vestberg in sod., 2002; Stewart in sod., 2005). Negativen vpliv na razvoj AM imata tudi solarizacija in uporaba kemičnega razkuževanja, npr. z MB (Brandán in sod., 2002; Branzanti in sod., 2002), medtem ko imajo posamezni tehnološki ukrepi, npr. kolobarjenje z majhnim dodajanjem hranil, zeleno gnojenje z ječmenom, zeleno gnojenje z rjavo gorjušico ter dodajanja komposta, na AM pozitiven vpliv (Branzanti in sod., 2002). Pozitiven vpliv na kolonizacijo korenin jagod z AM lahko dosežemo z dodajanjem inokulumov. Poznano je dodajanje naravnih inokulumov iz že obstoječih nasadov jagod ali dodajanje komercialnih inokulumov, ki jih predstavljajo izolirane spore posameznih vrst AM. V tleh, bogatih z organsko snovjo, je učinek mikoriznih gliv zmanjšan, torej z dodajanjem inokulumov ne dosežemo zelenega učinka (Muramoto, 2003; Bull in sod., 2005). Kot inokulum, se v komercialne ali poskusne namene uporabljajo glive *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae*, *Glomus*

*aggregatum*, *Glomus clarum*, *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita*, *Gigaspora rosea*, *Scutellospora calospora*, *Scutellospora heterogama*, *Scutellospora persica* in dr. Z dodajanjem inokulumov se zaradi večje kolonizacije poveča masa korenin in poganjkov, večji je sprejem P, večja je toleranca na boleznin in vodni stres. Posamezne glive zelo različno vplivajo na rast, razvoj in mineralno prehrano gostiteljske rastline (od negativno do pozitivno) (Taylor in Harrier, 2001; Matsubara in sod., 2004).

Poleg enojnih inokulacij z AM se v praksi in poskusih vse pogosteje izvajajo dvojne in mešane inokulacije z glivami in bakterijami. Vpliv multimikrobnih inokulacij z mikoriznimi glivami in bakterijami na rast in zdravstveno stanje jagod je lahko zelo različen, od pozitivnega do negativnega ali nevtralnega (Gryndler in sod., 2002; Vestberg in sod., 2004). Aplikacije AM-PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) imajo mnogo večji učinek na rast koreninskega sistema kot na rast poganjkov, zato se inokulacija vedno ne izrazi v povečani rasti vidnega dela rastlin, ampak je lahko celo v zmanjšani rasti (Malusa in sod., 2006). Za biotično varstvo škodljivih organizmov v tla samostojno vnašajo komercialne seve gliv *Trichoderma* spp., ki vplivajo na rast rastlin in na zmanjšanje vpliva škodljivih organizmov (Leandro in sod., 2007; Merchier in sod., 2007).

Simbioza rastlin z AM je ključni dejavnik trajnostnega kmetijstva. V konvencionalni pridelavi ima AM minimalno vlogo (Demir in Akkopru, 2007). Uspešno ekološko varovanje jagod pred škodljivimi organizmi je možno le z razumevanjem kompleksnega uravnavanja protiglivnih metabolitov, ki so produkt antagonistov v povezavi z zunanjimi dejavniki. Mikorizne glive so antagonistične glive škodljivim glivam in v rizosferi delujejo enako kot antagonistične bakterije (npr. *Pseudomonas fluorescens*, *Raoultella terrigena*, *Bacillus amylolique-faciens*) (Berg, 2007).

### 2.3.2 Temni septirani endofiti

Temni septirani endofiti oz. DSE glive (Dark Septate Endophytes) sta Smith in Read (1997) uvrstila med ektendomikorizne glive, ki z nekaterimi gostitelji tvorijo ektendomikorizo, z drugimi pa endomikorizo. DSE glive imajo melanizirane septirane hife, ki so bile prvič opisane kot *Mycelium radialis atrovirens*. Na koreninah gostiteljskih rastlin tvorijo mikrosklerocije in včasih Hartigovo mrežo. Poimenovane so z različnimi imeni (pseudomikoriza, šibki patogeni, septirani endofiti, temni septirani endofiti). DSE lahko funkcionirajo kot škodljive ali saprofitske glive, lahko pa tudi tvorijo mutualistično združbo, tako kot mikorizne glive. DSE se običajno pojavijo na ekstenzivnih rastiščih, hladnih rastiščih s pomanjkanjem hranil, tam kjer mikoriza ni tako uspešna (Barrow, 2003; Likar in Regvar, 2009). Posebnost DSE gliv je v tem, da kolonizirajo tudi stržen rastlinske korenine, medtem ko škodljive glive uničijo žilni sistem, mikoriza pa je omejena na epidermalne celice in ne prodira v stržen (Barrow, 2003). Jumpponen in Trappe (1998) sta te glive definirala kot devteromicetne glive (*Deuteromycota*), podobne askomicetnim glivam, ki kolonizirajo korenine rastlin brez negativnih vplivov na rastlino. Ko kolonizirajo ektomikorizne gostitelje, DSE nimajo Hartigove mreže, ampak v intracelularnem prostoru tvorijo mikrosklerocije različnih oblik. DSE glive so slabo definirane. Septirane hife so opazili v celičnem in medceličnem prostoru. Strukture se razlikujejo od mikoriznih. Zaradi nenavadnih struktur in nepoznanega vpliva na gostiteljsko rastlino, DSE glive ne pojmujejo kot mikorizne. V določenih razmerah

vplivajo na gostiteljevo rast s posredovanjem hranil, kar je enako kot pri mikorizi, vendar je nepojasnjeno, če s tem vplivajo na pridelek gostiteljskih rastlin (Jumpponen, 2001). Ugoden vpliv DSE na rast gostiteljskih rastlin je bil v nekaterih poskusih opazen predvsem v zgodnji fazi razvoja rastlin (Andrade-Linares in sod., 2011). Najpogostejša gliva v DSE kompleksu je *Phialocephala fortinii* (Ahlich in Sieber, 1996).

### 2.3.3 Škodljive glive na koreninah jagod

Med škodljivimi glivami jagod je zelo veliko takih, ki okužijo liste in plodove, vendar največjo gospodarsko škodo povzročajo škodljive koreninske glive rodov *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* in *Verticillium*. V pridelavi povzročajo škodo ne le zaradi zmanjševanja pridelka, ampak tudi zaradi manjše kakovosti plodov in odmiranja rastlin. Škodljive glive so temeljito raziskane v vseh pridelovalnih pogojih. Posebno dobro je raziskano področje varstva rastlin s fitofarmaceutskimi sredstvi. Alternativnih pristopov zatiranja koreninskih boleznih, ki bi bili sprejemljivi za ekološko in integrirano pridelavo je malo. V pridelavi sta med najpogosteje uporabljenimi alternativnimi metodami biofumigacija in solarizacija ali kombinacija obeh metod (Steffek in sod., 2006; Tsror in sod., 2007). Vpliv biofumigacije na škodljive glive je najpogosteje velik (Lazzeri in sod., 1999), je pa lahko tudi majhen (Johnston in sod., 2005) ali negativen (povečanje števila škodljivih organizmov) (Rosati, 2002; Mattner in sod., 2008). Rezultati so odvisni od tal, vremenskih razmer, vrste biocidne rastline, izvedbe ukrepa in drugih dejavnikov.

Ne le razvojni krog koreninskih škodljivih gliv, tudi razvojni krog gliv, ki povzročajo bolezni plodov, npr. siva plesen (*Botrytis cinerea*), je neposredno povezan z razmerami v tleh. Razvojni krog glive *Botrytis cinerea* je na severu Evrope drugačen od južno evropskega. Na severu gliva prezimi kot sklerociji ali micelij na ostankih rastlin v zemlji (Smith in sod., 1988), na jugu pa kot konidiji. V raziskavah, ki so jih opravili v Španiji, so ugotovili, da so glavni dejavniki, ki vplivajo na preživetje konidijev v zemlji temperatura, vlaga, svetloba in mikrobiološke aktivnosti (Coley-Smith, 1980). Konidiji sive plesni celo bolje preživijo v sterilnih tleh kot v nesterilnih. Na preživetje konidijev sive plesni imajo zelo velik vpliv MO, predvsem njeni antagonisti (Moyano in Melgarejo, 2002).

### 2.3.4 Interakcija med mikoriznimi glivami in škodljivimi organizmi

Mikorizne glive so antagonistične glive škodljivim glivam. Rastline z AM se pred škodljivimi MO zavarujejo s povečanjem sprejemanja hranil, nadomeščanjem poškodovanega koreninskega sistema s sistemom hif, s tekmovanjem za gostiteljeve produkte fotosinteze, s tekmovanjem za prostor kolonizacije na gostiteljski rastlini, z anatomskimi in morfološkimi spremembami na koreninskem sistemu gostitelja, z vzpodbujanjem obrambnega sistema gostiteljske rastline in s spremembo MO v rizosferi (Azcón-Aguilar in Barea, 1996; Demir in Akkopru, 2007). Izločki iz korenin z mikoriznimi glivami koloniziranih korenin onemogočijo sporulacijo škodljivih gliv (Norman in Hooker, 2000).

Med raziskovalci je mikoriza na jagodah najbolj obravnavana iz vidika odpornosti rastlin na koreninske glive, predvsem na glive *Phytophthora* spp. Kolonizacija korenin z mikoriznimi ali škodljivimi glivami je v veliki medsebojni povezanosti. Mikorizne glive

rastlino kolonizirajo neposredno po kaljenju, ko korenina hitro raste. V tem času je izdolževanje korenin zelo veliko in korenina potroši P iz zalog v semenu oz. pri jagodi iz zalog v koreniki. Izločanje koreninskih izločkov je največje v območju podaljševanja, to je tam, kjer se kolonizacija korenin tudi začne (Paraskevopoulou-Paroussi in sod., 1997). Za svoj razvoj glive prejemajo ogljik iz rastline, v zameno pa rastlinam dajejo P. Preden rastlina doseže dovolj velike količine P, so korenine dovzetne za okužbo s škodljivimi glivami. Ko v rastlini fosfor zagotovijo mikorizne glive, se zmanjšata prepustnost membran in količina koreninskih izločkov (Duncan, 2002). Zmanjša se tudi možnost okužb s škodljivimi glivami. To pomeni, da mikoriza z zagotavljanjem P posredno spreminja aktivnosti MO. Četudi mikorizne glive niso antagonisti škodljivim glivam, imajo s svojim delovanjem učinke biotičnega varstva rastlin. Mikorizne glive postanejo del bio kontrolnega sistema. Odnos med koreninami in mikorizo je obligaten in glive lahko direktno vplivajo na škodljive organizme korenin. Nadzor prepustnosti membrane s P je mehanizem, s katerim rastlina omejuje rast glive v korenini. Pri ektomikorizi je prodiranje glive omejeno s tvorbo fenolnih snovi in mogoče fitotoksinov. Podobna je tudi nekompatibilnost med AM in nemikoriznimi glivami (Graham, 1988; Brandán in sod., 2002).

Povsod, kjer je v kmetijskih rastlinah prisotna AM, je prisotna tudi združba rastlin s parazitskimi ogorčicami ali združba rastlin s škodljivimi glivami. V naravi je mešana okužba z AM glivami in škodljivimi organizmi na gostiteljskih rastlinah prej pravilo kot izjema. Poskusi vpliva AM na pridelek in aktivnost škodljivih organizmov se večinoma izvajajo v rastlinjakih, kajti soodvisnost med gostiteljskimi rastlinami, simbionti in škodljivimi organizmi je v naravi zelo težko izmeriti (Gosling in sod., 2006; Leandro in sod., 2007). Pogostnost bolezni se zaradi prisotnosti AM lahko poveča, zmanjša ali pa vpliva ni.

## **2.4 Določanje AM in DSE gliv**

### **2.4.1 Konvencionalno in molekulsko določanje AM gliv**

Določanje AM lahko izvajamo z različnimi konvencionalnimi ali molekulskimi tehnikami (Maček, 2009). Med najbolj pogosto uporabljenimi konvencionalnimi tehnikami so tiste, ki temeljijo na barvanju hif in oceni kolonizacije. Znani sta interseksijska tehnika Giovanettija in Mosseja (1980) ter ocenjevanje kolonizacije po Trouvelotu in sod. (1986). Pogosto razširjena je tudi metoda določanja AM na podlagi spor. Leta 1993 sta Walker in Trappe na podlagi morfologije spor opisala približno 150 vrst arbuskularnih mikoriznih gliv. Ker razvoj spor ni vedno odvisen od intenzitete mikorizne kolonizacije korenin, ta tehnika ne odraža dejanske AM kolonizacije.

Taksonomijo AM gliv, ki temelji na morfologiji spor je mogoče identificirati do reda ali rodu (Clapp in sod., 2002). V sodobnih raziskavah se določanje gliv vse bolj pogosto izvaja s številnimi molekulskimi tehnikami. Za ugotavljanje taksonomije AM uporabljamo zaporedja DNA, ki kodirajo ribosomsko RNA. Skupine genov rDNA so v jedrih in mitohondrijih. Enote rDNA vključujejo gene z malo ribosomsko podenoto (SSU- Small Subunit, 18S), veliko ribosomsko podenoto (LSU- Large Subunit, 28S) in podenoto 5,8S. Za ugotavljanje odnosov med daljno sorodnimi glivami se uporabljajo zaporedja sekvence na LSU in SSU, za ugotavljanje sorodstvenih vezi na nižji taksonomski ravni pa bolj

variabilna zaporedja ITS (Internal Transcribed Spaces) in IGS (Intergenic Spacer) (Bridge, 1998). Analiza ribosomalnih genov nam pojasni filogenezo AM gliv (Simon in sod., 1992; Stürmer, 2012).

S pomočjo PCR (Polymerase Chain Reaction - verižna reakcija s polimerazo) tehnike za razmnoževanje DNA, se je možno iz ITS regije, ob izbiri različnih začetnih oligonukleotidov, osredotočiti na posamezne podskupine rDNA. Prvi specifični začetni oligonukleotid VANS1, s katerim je bilo mogoče pomnoževati glivno DNA neposredno iz korenin rastline, so razvili Simon in sod. (1992). Za izdelavo začetnih oligonukleotidov za ločevanje vrst in rodov mikoriznih gliv iz korenin so rastline okužili s specifičnimi glivami tudi Millner in sod. (1998). Sekvence DNA iz različnih rodov *Glomus* so primerjali s 5,8S gensko podenoto (155 bp), ITS2 regijo (230 bp) in ITS1 (135 bp) (Millner in sod., 2001).

Helgason in sod. (1998) so izdelali začetni oligonukleotid AM1, ki je specifičen za AM glive in deluje v povezavi z NS31 (splošni evkariontski začetni oligonukleotid). AM1 in NS31 pomnožujeta SSU. Vandenkoornhuyse in Leyval sta 1998 izdelala začetna oligonukleotida, ki sta specifična za debli *Zygomycota* in *Glomeromycota* MH2 in MH4 in pomnožujeta regijo SSU. Redecker (2000) je izdelal pet začetnih oligonukleotidov, ki imajo tarčna mesta na SSU ali ITS in so specifični za pet podskupin reda *Glomales*. Zelo veliko raziskav je bilo narejenih tudi na ITS regiji. Univerzalna začetna oligonukleotida za evkariontske regije ITS4 in ITS1 so leta 1990 izdelali White in sod.

Produkte PCR namnoženih AM gliv očistimo in kloniramo v vektor (plazmid) ter na ta način ločimo posamezne tipe AM gliv. Po transformaciji vektorja v kompetentne celice *Escherichia coli* ter pomnoževanju, dobimo posamezne tipe AM gliv. Sledi še restrikcija z encimi in analiza, ki jo lahko izvajamo z različnimi molekulskimi tehnikami (Maček, 2009). Med najbolj razširjenimi so Random Amplified DNA Polymorphism (RAPD); Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP); Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP); Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DDGE) in Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) (Longato in Bonfante, 1997; Cornejo in sod., 2004; De Souza in sod., 2004; Whipps, 2004). TTGE oz. poliakrilamidna gelska elektroforeza v temperaturnem gradientu je tehnika, pri kateri produkte PCR podobnih velikosti med seboj ločimo na osnovi denaturacije, ki je posledica denaturanta v gelu in postopnega poviševanja temperature. Zadnjo fazo predstavljata sekvenciranje produktov in obdelava sekvenc (Sonjak in sod., 2008).

#### **2.4.2 Določanje DSE in ostalih koreninskih endofitov**

Tehnike identifikacije DSE gliv so zelo podobne ali enake prej naštetim tehnikam za določanje AM in ostalih endofitov, med njimi tudi škodljivih gliv. Za pomnoževanje rDNA pri najbolj razširjeni DSE *Phialocephala fortinii* so Grünig in sod. (2002) uporabili različne ITS začetne oligonukleotide in ISSR-PCR molekulske tehnike.

Hitro določanje škodljivih gliv v rastlinah pomaga pri uspešnem zatiranju bolezni. Tradicionalne metode izolacije in identifikacije gliv so dolgotrajne, vendar večina raziskovalcev in pridelovalcev bolezni določa na podlagi bolezenskih znamenj, ki se razvijejo na rastlini (Karajeh in Masoud, 2006). Molekulske tehnike imajo mnoge

prednosti v primerjavi s tradicionalnimi tehnikami, ki temeljijo na izolaciji gliv. Uporaba genskih slik (fingerprint) povzročiteljev bolezni je edina praktična metoda za določanje bolezni, preden se razvijejo simptomi. Ker so povzročiteljice bolezni iz številnih rodov, je določanje gliv za vsako skupino posebno. Glive običajno izolirajo iz okuženih ali potencialno okuženih rastlinskih delov ali tal (Filion in sod., 2003; Irzykowska in sod., 2005; Qin, 2006). Pravilna identifikacija škodljive glive je ključna za varstvo gojenih rastlin.



### 3 NAMEN IN HIPOTEZE

#### 3.1 Namen

Intenzivna pridelava jagod vključuje tehnološke ukrepe priprave tal in varstva rastlin, ki se morajo ob vse večji skrbi za okolje in zdravje ljudi ter ob vse večjem prehajanju na ekološko pridelavo nujno spremeniti. Fizikalne, kemične in biološke lastnosti tal neposredno vplivajo na kakovost in količino pridelka jagod. V vseh tehnologijah pri zasaditvi nasadov dajemo velik poudarek izbiri lege, lokaciji ter pripravi tal. Pri tem je pomembno upoštevanje večletnega kolobarja in poznavanje rastlin, primernih za kolobarjenje. S tem se izognemo enostranskemu izčrpavanju hranil iz tal, predvsem pa škodljivim koreninskim glivam, ki predstavljajo enega izmed najtežje rešljivih problemov v pridelavi jagod. Pri visoko intenzivnih tehnologijah vlogo kolobarja pridelovalci nadomestijo s kemičnim razkuževanjem tal. Mnoga izmed sredstev za razkuževanje tal so zdravju škodljiva in naravi neprijazna. V Sloveniji in nekaterih drugih državah so kemična sredstva za razkuževanje tal v pridelavi jagod prepovedana, kar slovenske pridelavalce postavlja v nekonkurenčen položaj v primerjavi s tujimi, ki se pojavljajo na slovenskem trgu. Pridelovalni pogoji so izenačeni le v ekološki pridelavi, v kateri za tujimi pridelovalci zaostajamo le v uvajanju alternativnih oblik razkuževanja tal. Z alternativnimi metodami razkuževanja tal (solarizacija in biofumigacija) posegamo ne le v življenje škodljivih organizmov, temveč tudi v življenje koristnih mikroorganizmov kot so npr. mikorizne glive. V raziskavi smo se osredotočili na posledice solarizacije in biofumigacije na razvoj jagod ter mikoriznih in DSE gliv v primerjavi s kontrolo in kemičnim razkuževanjem v naravnih tleh ter v substratih. Za določanje populacije mikoriznih in DSE gliv smo poleg mikroskopske tehnike uporabili tudi molekulsko PCR in TTGE tehniko, s katerima smo želeli ne le zaznati pristnost gliv in intenziteto njihove infekcije, temveč tudi določiti njihovo diverzitetu. Zanimale so nas razlike v meritvah posameznih parametrov mikoriznosti ob izvajanju alternativnih ukrepov na prostem (polje) in v zavarovanem prostoru v rastnih substratih. V nalogi škodljive glive niso predmet raziskav, saj je delovanje solarizacije in biofumigacije na škodljive organizme nesporno in temeljito raziskano. Namen naloge je v raziskovanju vpliva navedenih metod razkuževanja na mikorizne glive in posreden vpliv na pridelek. Če bi bilo delovanje negativno, bi namreč uporabo teh metod težko opravičevali v kakršnih koli tehnologijah pridelovanja.

Cilj naloge je ovrednotiti vpliv alternativnih metod razkuževanja na tla v integrirani oziroma ekološki pridelavi jagod. Kratkoročno se metode razkuževanja izrazijo v pridelku, dolgoročno pa v kakovosti tal, izraženi v založenosti s hranili, strukturnosti tal in mikrobiološki aktivnosti. V nalogi sta bili ovrednoteni metodi solarizacije z dvema različnima folijama in dvema trajanjema prekriivanja ter biofumigacije s tremi različnimi biocidnimi in eno nebiocidno rastlino ločeno, kljub temu, da vemo, da v slovenskih pedoklimatskih razmerah solarizacija kot samostojen ukrep, ne more imeti zelenega učinka. Predpostavili smo, da je solarizacija v kombinaciji z drugimi metodami razkuževanja (v našem poskusu biofumigacijo), lahko zelo uspešna. Uvajanje alternativnih metod razkuževanja v predpripravo tal bi imelo izrazito pozitiven vpliv na skrajšanje večletnega kolobarja na eno do dve leti. V slovenski posestni strukturi prevladujejo majhne in razseljene parcele. Zaradi nujnosti večletnega kolobarja v pridelavi posameznih kultur,

je prav to pogost razlog za opustitev ekonomsko uspešne pridelave določene kulture, kamor sodijo tudi jagode.

### **3.2 Hipoteze**

1. Biofumigacija in solarizacija sta za rast in rodnost jagod enako učinkoviti kot razkuževanje tal s kemičnimi sredstvi.
2. Biocidne rastline vplivajo na povečanje organske snovi in hranil v tleh ter s tem na rast in rodnost jagod.
3. Z alternativnimi metodami razkuževanja tal zavremo rast plevelnih rastlin ter uničimo DSE in škodljive koreninske glive.
4. Biocidne rastline vsebujejo različne vrste in količine glukozinolatov, ki ne zmanjšajo populacij AM v jagodah.
5. Solarizacija stopnje mikorizne kolonizacije jagod ne spremeni oz. so spremembe minimalne.
6. Različne folije in čas prekrivanja tal s folijami ter vremenske razmere bistveno vplivajo na temperaturo tal in s tem posredno na mikorizne glive in rast jagod.
7. Kemično razkuževanje tal uniči arbuskularno mikorizo jagod.
8. Inokulacija jagod z naravnim mikoriznim inokulumom vpliva na večjo mikorizno kolonizacijo in posredno na rast in rodnost jagod.
9. Z molekulskimi tehnikami lahko v koreninah jagod potrdimo prisotnost AM, DSE in škodljivih gliv, kar je lahko pripomoček za uspešno usmerjanje tehnoloških ukrepov.

## 4 MATERIAL IN METODE

Naloga je bila zasnovana v treh zaporednih lončnih poskusih in poljskem poskusu na jagodah sorte 'Marmolada'. Lončne poskuse smo izvajali v rastni omari, mrežniku in rastlinjaku na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani, poljski poskus pa v poskusnem sadovnjaku Kmetijskega inštituta Slovenije, na Brdu pri Lukovici. Analitski del rastlinskega materiala in vzorcev zemlje je potekal v Centralnem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije. Molekulska identifikacija gliv je potekala v laboratorijih Katedre za fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

### 4.1 Lončni poskusi

Lončne poskuse (LP) smo posadili v treh zaporednih letih (2003 – 2005). Prvi poskus (LP I) smo posadili 15. julija 2003, 29 dni po pripravi substratov, drugega (LP II) 22. decembra 2003, 12 dni po pripravi substratov in tretjega (LP III) 10. avgusta 2004, 22 dni po pripravi substratov. Polovici poskusnih rastlin v LP I in LP II smo del zemlje nadomestili z mikoriznim inokulumom, polovica pa je bila brez dodanega inokuluma. V tretjem lončnem poskusu obravnavanjem ni bil dodan MI.

#### 4.1.1 Zasnova poskusov

Lončni poskusi so bili zasnovani v naključnih skupinah. Prva dva lončna poskusa sta bila zasnovana kot poskusa z dvema dejavnikoma (dvofaktorski poskus) s po 6 obravnavanji. Vsako obravnavanje je imelo 15 enot (rastlin) v zasnovi slučajne skupine. Dejavniki oz. faktorji je predstavljal MI (mikorizni inokulum), ki je bil obravnavanjem dodan ali ne. Tretji lončni poskus je bil zasnovan kot slučajne skupine s 6 obravnavanji.

#### 4.1.2 Vzgoja mikoriznega inokuluma

Naravni mikorizni inokulum smo vzgojili tako, da smo v zemljo, odvzeto iz neposredne bližine koreninskega sistema jagod iz ekološkega nasada, posejali koruzo, za katero je znana velika stopnja kolonizacije z mikoriznimi glivami. Delež spor se je po večkratnem sejanju koruze povečeval. Mikorizna kolonizacija korenin koruze pred zasnovo prvega lončnega poskusa je bila: F% = 96,7; M% = 20,9; m% = 21,5; A% = 10,9; a% = 52,2. Kolonizacije korenin koruze pred izvedbo drugega poskusa nismo ovrednotili, vendar se je inokulum za drugi poskus nedvomno razlikoval od inokuluma uporabljenega v prvem poskusu.

#### 4.1.3 Priprava substratov oz. mešanic zemlje

V vseh treh LP smo substrate v posameznih obravnavanjih pripravili tako, da so bila razmerja med sestavinami substratov v vseh poskusih enaka. Substrati, obravnavanja in oznake obravnavanj v lončnih poskusih so navedeni v Preglednici 1. Poskusi so potekali v 350 ml lončkih. V prvem lončnem poskusu je zaradi pomanjkanja MI izpadlo obravnavanje SOL+MI. Drugi lončni poskus je bil izveden v celoti, tretji v letu 2004 – 2005, pa je bil izveden le z obravnavanji brez dodanega MI.

Preglednica 1: Obravnavanja in oznake obravnavanj v lončnih poskusih

Table 1: Treatments and tags of treatments in pot experiments

Substrat	Obravnavanje	Oznaka Brez MI	Z MI
Biocidne rastline za podor	<i>Brasica juncea</i> / rjava gorjušica / sorta Negro Caballo	Bj	Bj+MI
	<i>Sinapis alba</i> / bela gorjušica / sorta Asta	Sa	Sa+MI
	<i>Eruca sativa</i> / navadna rukvica	Es	Es+MI
Solarizacija	Toplotna obdelava zemlje na 37 °C (200 ur)	SOL	SOL+MI
Kemično razkuževanje	Dazomet / Basamid (trgovsko ime)	D	D+MI
Neobdelana zemlja	Kontrola	K	K+MI

#### 4.1.3.1 Substrati z biocidnimi rastlinami (Bj, Sa, Es)

Substrate z biocidnimi rastlinami brez MI smo sestavili iz 250 g zemlje iz poskusnega nasada na Brdu pri Lukovici in 25 g zmletih, zamrznjenih biocidnih rastlin (Bj, Sa in Es). V obravnavanjih z MI je bil substrat sestavljen iz 150 g zemlje, 25 g zmlete biocidne rastline in 100 g mikoriznega inokuluma, ki je v substratu z MI predstavljal velik delž.

Biocidne rastline za pripravo substrata smo posejali 28. aprila 2003 na Brdu pri Lukovici. Rastline smo pokosili 11. junija, 44 dni po sejanju, v obdobju najbolj bujne rasti, tik pred cvetenjem. Cele rastline smo zamrznili na -20 °C. Pred pripravo substratov smo rastline zmleli z gospodinjskim multipraktikom (Bosch). Analize skupnih GSL biocidnih rastlin so bile opravljene iz zamrznjenega rastlinskega materiala, v obdobju priprave substratov (Priloga A). Analize so bile opravljene po metodi ISO 10633-1:1995 Oilseed residues – Determination of glucosinolates content – Part 1, na HPLC Waters (Milford, Massachusetts, USA), v Centralnem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije. Količino biocidnih rastlin smo določili na podlagi izkušenj iz poljskega poskusa in podatkov iz literature (Priloga B) (Acuti in sod., 2001). Zamrznjene biocidne rastline smo uporabili za pripravo substrata v vseh treh lončnih poskusih.

V substrate smo vedno vnesli enako količino organske snovi in sicer 25 g zmletih biocidnih rastlin, ne glede na vrsto, kar je približno 14 kg organske snovi na m<sup>2</sup> površine. Skupna količina vnesenih GSL je bila v obravnavanju Bj 78,9 mg GSL na kg zemlje, pri Sa 28,6 mg in pri Es 75,2 mg GSL na kg zemlje (Priloga C). V lončnih poskusih smo količino dodane organske snovi, v primerjavi s poljskim poskusom, povečali v skladu s podatki iz literature (Lazzeri in Manici, 2001) in na podlagi lastnih izkušenj iz predhodnih poskusov.

#### **4.1.3.2 Solarizacija – toplotno obdelana zemlja (SOL)**

Obravnavanje SOL smo zasnovali na podlagi podatkov iz literature in poljskih poskusov v letih 2002 in 2003. V obravnavanjih SOL brez MI smo v 350 ml lonček dali 275 g predhodno toplotno obdelane (solarizirane) zemlje. V obravnavanjih z MI je bil substrat sestavljen iz 175 g solarizirane zemlje in 100 g MI.

Škodljive organizme zatremo s segrevanjem zemlje nad 37 °C, za daljše časovno obdobje. Skupno število ur nad 37 °C na globini 15 cm naj bi bilo od 800 do 900 (Rosati, 2002). Glede na to, da v naših klimatskih razmerah takega števila ur v tleh ne moremo doseči (Priloga D-1 in D-2), smo zemljo 200 ur ogrevali na temperaturi 37 °C (Komora Kambič, Slovenija). Število ur segrevanja zemlje smo določili na osnovi meritev v predhodnih poljskih poskusih z namenom, da bi bila obravnavanja v lončnih poskusih primerljiva z razmerami, ki so v klimatskem območju poskusnega nasada in tipa tal v normalnem poletnem času dosegljive.

#### **4.1.3.3 Dazomet - kemično razkužena zemlja (D)**

V obravnavanjih z dazometom smo v 350 ml lonček dali 275 g predhodno kemično razkužene zemlje. V obravnavanjih z MI je bil substrat sestavljen iz 175 g kemično razkužene zemlje in 100 g mikoriznega inokuluma.

Kemično razkuževanje smo izvedli tako, da smo zemljo iz nasada na Brdu pri Lukovici (rastišče poljskega poskusa) pomešali z dazometom (50 g/m<sup>2</sup>). Po tretiranju smo zemljo zalili in za dva tedna prekrili s PE folijo. Odkrito smo zračili dva meseca. Predvidevamo, da je bila koncentracija dazometa v substratu za prvi in drugi lončni poskus prevelika, čeprav je bila količina sredstva primerljiva s količino v poljskem poskusu. Za LP III je bila količina dazometa za polovico manjša, 25 g/m<sup>2</sup>.

#### **4.1.3.4 Kontrola (K)**

Kontrolno obravnavanje je v lončnih poskusih predstavljala zemlja, odvzeta iz neposredne bližine rastišča jagod v poljskem poskusu. Ista zemlja je bila uporabljena v vseh substratih oz. mešanica zemlje. V obravnavanjih brez MI smo v lonček dali 275 g zemlje. V obravnavanjih z MI je bila mešanica sestavljena iz 175 g zemlje in 100 g MI.

#### **4.1.4 Gojenje sadik**

Sadike sorte 'Marmolada' smo za lončne poskuse tkivno razmnoževali in vzgajali na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Razmnoževanje in vzgoja sta potekala na MS mediju, z dodatkom BAPa, ki vpliva na večje razraščanje rastlin (Berljak in sod., 2003). Za tkivno vzgojo sadik smo se odločili zato, da ne bi bile rastline za izvedbo lončnega poskusa predhodno kolonizirane s kakršnimi koli mikoriznimi ali nemikoriznimi glivami. Rastline smo gojili v epruvetah, v rastni komori s 16 urnim dnevnim in 8 urnim nočnim ciklom. Temperatura v dnevnem ciklu je bila 24 °C, v nočnem pa 20 °C. Na MS mediju smo rastline pred sajenjem v substrat prestavili 3 do 5 krat, nato pa jih presadili v sadilne platoje v steriliziran šotni substrat za presajanje (Klasman). Po presajanju smo rastline v

rastlinjaku utrjevali približno en mesec (dnevno/nočne temperature – 22/18 °C; 14 urni dnevni cikel). Po zaključku utrjevanja smo rastline presadili v substrate oz. mešanice, ki so predstavljali naša obravnavanja. Poskusi so nadalje potekali v rastlinjaku, kjer so bili pogoji rasti v poletno jesenskem času odvisni od zunanjih dejavnikov, v zimsko spomladanskem pa enaki pogojem utrjevanja rastlin.

#### **4.1.5 Spremljanje parametrov rasti in razvoja jagod**

Parametre rasti in razvoja rastlin v lončnih in v poljskem poskusu nismo spremljali na enak način. Razlog je bil v različnem tipu sadilnega materiala. Rast tkivno vzgojenih sadik je bila, v primerjavi s hlajenimi sadikami v poljskem poskusu, izrazito šibka. Intenzivnost rasti smo ovrednotili z meritvijo mase svežih listov po zaključku obiranja (Tehtnica Exacta 2200 EB). V LP I so bili listi porezani po 12 mesecih (juliju 2004); v LP II po 8 mesecih (avgust 2004) in v LP III po 12 mesecih (avgust 2005).

#### **4.1.6 Spremljanje parametrov rodnosti**

Pridelek smo ovrednotili s številom plodov. Potencial rodnosti tkivno vzgojenih rastlin je bil v primerjavi s klasično vzgojenimi, hlajenimi rastlinami, majhen. Poskusi so potekali v rastlinjaku, kjer so bili plodovi zaradi slabše oplodnje majhni in slabo razviti, neprimerljivi s plodovi v poljskem poskusu. Na posamezni rastlini smo plodove prešteli pred pričetkom zorenja. V LP I smo štetje plodov opravili 12. maja 2004; v LP II 23. julija 2004 in v LP III 28. aprila 2005.

#### **4.1.7 Rast plevelnih rastlin**

V lončnih poskusih smo ozkolistne in širokolistne plevelne šteli skupaj. V LP I prvič 29. julija 2003 (2 tedna po sajenju) in drugič 2. septembra 2003 (7 tednov po sajenju). V LP II je plevel potekala 10. februarja (7 tednov po sajenju) in v LP III 2. septembra 2004 (3 tedne po sajenju).

#### **4.1.8 Ocenjevanje parametrov mikorizne in nemikorizne kolonizacije**

##### **4.1.8.1 Odvzem korenin**

Korenine smo v prvem lončnem poskusu odvzeli 2. septembra 2003, v drugem 10. februarja 2004 in v tretjem 29. september 2004, vedno 50 dni po sajenju. Rastline smo izlončili in iz obrobja koreninske grude odvzeli vzorec. Korenine smo dali v plastične posodice in jih prelili z Blesovim fiksativom (90 ml 70 % etanola, 7 ml 40 % formaldehida in 4 g očetne kisline), ki omogoča daljše skladiščenje vzorcev. V vsakem obravnavanju smo vzorce odvzeli pri 10 rastlinah. Pri vsaki rastlini smo ovrednotili po 30 en cm dolgih delov korenin.

#### 4.1.8.2 Barvanje korenin z barvilom tripan modro

Korenine jagod smo obarvali po metodi Phillips in Hayman (1970). Po fiksaciji v Blessovem fiksativu smo jih spirali s tekočo vodo. Ob zadnjem izpiranju smo korenine za dalj časa pustili v destilirani vodi in po odlitju vode prelili z 10% KOH in jih za 45 min segrevali v sušilniku na temperaturi 90 °C. Po tem postopku smo korenine sprali s tekočo vodo in jih ob zadnjem izpiranju pustili v destilirani vodi. Po izpiranju smo korenine prelili z barvilom tripan modro (Trypan blue) (40 g mlečne kisline, 80 g glicerina, 40 g destilirane vode, 0,08 g barvila tripan modro) in jih ponovno 5 min segrevali v sušilniku na temperaturi 90 °C. Po barvanju smo korenine izprali in jih prelili z laktofenolom brez fenola (40 g destilirane vode, 40 g mlečne kisline, 80 g glicerina), v katerem smo jih imeli do pregleda pod mikroskopom. 10 % raztopina KOH razbarva citoplazmo in jedro koreninskih celic in tako omogoči prodiranje barvila v tkivo. Na ta način barvilo obarva hitin v celičnih stenah (Phillips in Hayman, 1970).

#### 4.1.8.3 Priprava preparatov za mikroskopiranje

Morfologijo korenin smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom Reichert 310 No. 2458 (Reichert, Inc., Depew, NY, ZDA), pri 100 kratni povečavi. V vsakem vzorcu smo ovrednotili 30 delov koreninskega sistema posamezne rastline. Deli celic korenin so po obarvanju z barvilom tripan modro ostali nespremenjeni, deli gliv, ki so vsebovali hitin, pa so se obarvali intenzivno modro. Pod mikroskopom so bile vidne hife, arbuskuli, spore in vezikli. Na koreninah smo poleg mikoriznih gliv opazili tudi neznane mikrosklerocije predvidoma DSE ali škodljivih gliv.

#### 4.1.8.4 Ocena kolonizacije korenin jagod z mikorizo

Prisotnost gliv v koreninah jagod smo ovrednotili s frekvenco mikorize (F%) (Priloga E, Priloga F-1, Priloga F-2), intenziteto mikorize (M%) (Priloga F-3), intenziteto mikorize v koloniziranih delih korenin (m%), gostoto arbuskulov (A%) (Priloga F-4) in gostoto arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%). Spremljali smo tudi delež korenin z vezikli (Priloga F-5 in F-6), sporami (Priloga F-7) in temnimi septiranimi endofiti (DSE) oz. nepoznanimi koreninskimi endofiti.

Intenzivnost mikorizne kolonizacije smo vrednotili po metodi Trouvelot, ki temelji na oceni in razvrščanju korenin v razrede na podlagi posameznih struktur, tipičnih za AM glive. Parametre kolonizacije korenin z mikoriznimi glivami smo izračunali s programom MycoCalc (Trouvelot in sod., 1986).

Mikoriznost smo ovrednotili s parametri:

- Frekvenca mikorize (F%), ki odraža razpoložljivost AM propagulov v tleh.
- Intenziteta mikorize (M%), ki nam pove, kolikšen del koreninske skorje je koloniziran z AM glivami.
- Intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%), ki odraža infektivnost glive tudi v primeru nizke razpoložljivosti inokuluma v tleh.
- Gostota arbuskulov (A%), ki daje kvalitativno oceno mikorize *in situ*.

- Gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%), ki nam pove, kolikšna je gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno infekcijo. Formule za izračun posameznih parametrov so navedene v prilogi E.

#### 4.1.8.5 Ocena veziklov AM

Oceno veziklov smo v obravnavanih ovrednotili z deležem rastlin, ki so imele vezikle. Vezikle smo pod mikroskopom spremljali sočasno z vrednotenjem ostalih parametrov mikoriznosti.

#### 4.1.8.6 Ocena DSE in nepoznanih koreninskih endofitov

V poskusih smo poleg mikoriznih gliv spremljali tudi delež rastlin z nepoznanimi strukturami (mikrosklerociji), ki so lahko pripadale DSE, škodljivim glivam oziroma nepoznanim koreninskim endofitom. Mikrosklerocije smo spremljali pod mikroskopom sočasno z vrednotenjem ostalih parametrov mikoriznosti.

#### 4.1.8.7 Fotografiranje preparatov

Preparate smo fotografirali z digitalno kamero (Nikon) na mikroskopu, kombiniranim in povezanim s PC, opremljenim s programom za analizo slik (LUCIA).

### 4.1.9 Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za glomeromicete

#### 4.1.9.1 Odbira in odvzem vzorcev

Za molekulsko identifikacijo mikoriznih gliv smo na podlagi predhodnih podatkov o mikorizni kolonizaciji rastlin, odbrali rastline iz drugega lončnega poskusa (Preglednica 2).

Preglednica 2: Številka in izvor vzorca za molekulsko identifikacijo mikoriznih in DSE gliv oz. nepoznanih koreninskih endofitov

Table 2: The number and origin of sample for molecular identification of mycorrhizal and DSE fungi or unknown root endophytes

Številka vzorca	Izvor vzorca	Oznaka vzorca	Kolonizacija korenin
1	<i>Eruca sativa</i> + MI	Es + MI 1	DSE* – Tip 1
2	<i>Sinapis alba</i> +MI	Sa + MI 6	DSE – Tip 2
3	<i>Eruca sativa</i>	Es 6	DSE – Tip 6
4	<i>Eruca sativa</i>	Es 10	DSE – Tip 3
5	Kontrola	K 2	Arbuskuli
6	Kontrola	K 10	Arbuskuli
7	Kontrola	K 13	Arbuskuli
8	Kontrola	K 2 + K 10 + K13	Arbuskuli

\*DSE oz. nepoznani koreninski endofiti



Odbrali smo rastline, ki so imele ob odvzemu vzorcev za vrednotenje parametrov mikoriznosti (7 tednov po sajenju) visoko gostoto arbuskulov v koreninskem sistemu (A%) in rastline, v katerih smo opazili mikrosklerocije nepoznanih gliv (DSE, škodljivi in nepoznani koreninski endofiti). Vzorci za molekulsko identifikacijo (> 150 mg korenin) so bili odvzeti 10 mesecev po sajenju. Odvzeti so bili iz obravnavanj z biocidno rastlino *Eruca sativa* z dodanim MI in brez dodanega MI, iz obravnavanja z biocidno rastlino *Sinapis alba* ter iz kontrolnega obravnavanja (K) brez dodanega MI. Eden izmed vzorcev je bil sestavljen iz posameznih vzorcev kontrolnih rastlin.

#### 4.1.9.2 Izolacija DNA iz korenin

V mikrocentrifugirke smo zatehtali od 100 do 150 mg korenin, ki smo jih oprali pod tekočo, destilirano in sterilizirano vodo ter jih osušili. Korenine smo v ohlajeni terilnici strli s tekočim dušikom in jih prenesli v 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke. Skupno DNA smo iz korenin odbranih vzorcev izolirali z GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma – Aldrich). Izolirano DNA smo hranili v zamrzovalniku na temperaturi -20 °C.

#### 4.1.9.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

S PCR smo pomnoževali odseke male ribosomske podenote (SSU-rDNA). Za pomnoževanje DNA vseh odbranih vzorcev smo najprej uporabili začetna oligonukleotida NS31 in AM1 ter MH2 in MH4, ki sta specifična oligonukleotida za glive. Nadalje smo uporabili še začetna oligonukleotida NS31-GC in Glo1. PCR je potekal v MiniCycler PTC-150 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, ZDA).

##### 4.1.9.3.1 PCR z začetnima oligonukleotidoma AM1 in NS31

V PCR z AM1 in NS31 smo vključili direktne produkte DNA vzorcev 5, 6 in 7, ki smo jih izolirali iz vzorcev z AM (kontrolna obravnavanja). PCR je potekal z oligonukleotidom AM1 (Helgason in sod., 1998), ki je specifičen za arbuskularno mikorizo in NS31 (Simon in sod., 1992), ki je univerzalni eukariontski začetni oligonukleotid. Sestavine PCR mešanice so navedene v preglednici 3. Pomnožitev DNA je potekala v pogojih, ki so navedeni v preglednici 4. Produkti PCR z AM1 in NS31 so označeni s 5A, 6A in 7A (Slika 1).

Preglednica 3: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z AM1 in NS31

Table 3: Components of the mixture for PCR amplification with AM1 and NS31

Sestavine mešanice	Volumen založne koncentracije za eno reakcijsko mešanico PCR (25 µl)
10 X PCR pufer	2,5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 µl
Začetni oligonukleotid AM1 (20 pmol/ µl)	0,5 µl
Začetni oligonukleotid NS31 (20 pmol/ µl)	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Polimeraza <i>Taq</i> (5 U/ µl)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O (bidestilirana sterilna voda)	18,25 µl
Vzorec (DNA izolat)	1,00 µl

Preglednica 4 : Parametri cikla za pomnoževanje DNA z AM1 in NS31

Table 4: Cycle parameters for amplification of DNA with AM1 and NS31

	T (°C)	T (min:s)	Ponovitev cikla
Začetna denaturacija	94	3:00	1 x
Denaturacija	94	0:30	
Vezava začetnih oligonukleotidov	59	1:00	25 x
Elongacija	72	1:30	
Končna elongacija	72	8:00	1 x
Ohranjanje produkta	4	∞	

V drugem PCR z AM1 in NS31 z enako mešanico in parametri pomnoževanja kot v prvem PCR, so bili vključeni direktni produkti DNA iz korenin osmih odbranih vzorcev (Preglednica 2). Mešanica za pomnoževanje je navedena v preglednici 3, parametri pomnoževanja pa v preglednici 4. Produkti PCR z AM1 in NS31 so označeni z oznakami od 1C do 8C (Slika 1).

#### 4.1.9.3.2 PCR z začetnima oligonukleotidoma MH2 in MH4

V PCR z MH2 in MH4 je bilo vključenih 8 direktnih produktov DNA iz drugega lončnega poskusa (Preglednica 2). PCR mešanico, ki se je od PCR mešanice v prilogi 3 razlikovala le v začetnih oligonukleotidih MH2 in MH4, smo centrifugirali v ohlajeni centrifugi. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 24 µl PCR-mešanice in dodali 1 µl izolirane DNA. Pomnožitev DNA je potekala v pogojih, ki so navedeni v preglednici 5. PCR je potekal z univerzalnima glivnima oligonukleotidoma MH2 in MH4 (Vandenkoornhuysse in Leyval, 1998). Produkti PCR z MH2 in MH4 so označeni z oznakami od 1 do 8 (Slika 1).

Preglednica 5: Parametri cikla za pomnoževanje DNA z MH2 in MH4

Table 5: Cycle parameters for amplification of DNA with MH2 and MH4

	T (°C)	T (min:s)	Ponovitev cikla
Začetna denaturacija	95	2:00	1 x
Denaturacija	95	1:00	
Vezava začetnih oligonukleotidov	62	1:30	30 x
Elongacija	72	2:00	
Končna elongacija	72	8:00	1 x
Ohranjanje produkta	4	∞	

Produkte iz PCR z MH2 in MH4 smo nadalje vključili v vgnezdene PCR z AM1 in NS31. Mešanica za pomnoževanje je navedena v preglednici 3, parametri pomnoževanja pa v preglednici 5. Produkti vgnezdene PCR z AM1 in NS31 so označeni z oznakami od 1B do 8B (Slika 1).

#### 4.1.9.3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu

Agarozni gel za elektroforezo smo pripravili tako, da smo agarozo (0,40 g) raztopili v 40 ml pufru 0,5 x TBE ter ogrevali v mikrovalovni pečici. Sestava založne raztopine pufru za

1l TE pufru je: Tris baza 54 g; borova kislina 27,5 g; Na<sub>2</sub>EDTA x2H<sub>2</sub>O 4,65 g in dH<sub>2</sub>O do 1 l. Delno ohlajeni raztopini smo dodali 0,8 µl etidijevega bromida (BioRad, Hercules, CA, ZDA) in raztopino vlili v nosilec velikosti 10 x 6 cm. PCR produkte smo na parafilmu pomešali z barvilom, nato pa jih z mikropipeto nanесли v luknjice v gelu. Sestava elektroforeznega barvila: EDTA 20 mM; glicerol 10 %; N-Lauroylsarcosine 1 %; bromfenol modro 0,1 %. Na gel smo nanесли tudi 100 bp in 1 kb DNA (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder; Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder), ki nam je služil za določitev velikosti fragmentov pomnoženih s PCR.

Elektroforeza je potekala v posodi z elektroforeznim pufrom 0,5x TBE približno 30 min. Napetost med anodo in katodo je bila 90 V. Kontrolo PCR produktov smo opravili vizualno, pod UV svetilko. Gel smo fotografirali (UVI Photo).

#### 4.1.9.3.4 Pomnoževanje za TTGE

V PCR so bili vključeni produkti iz predhodnih PCR (Slika 1) ter standardni vzorci mikoriznih in DSE gliv: *Cylindrobasidium* sp. (stara) (23 S), *Cylindrobasidium* sp.(nova) (2/24 C), *Phialophora gregata* (P.g.), *Glomus* sp. (9M/2) (iz zbirke gliv Oddelka za fiziologijo rastlin). DNA smo pomnoževali z začetnima oligonukleotidoma NS31-GC in Glo1, ki pomnožujeta odsek male ribosomske podenote velikosti 230 bp. Mešanica za pomnoževanje je navedena v preglednici 6, parametri pomnoževanja pa v preglednici 7.

Preglednica 6: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z NS31-GC in Glo1

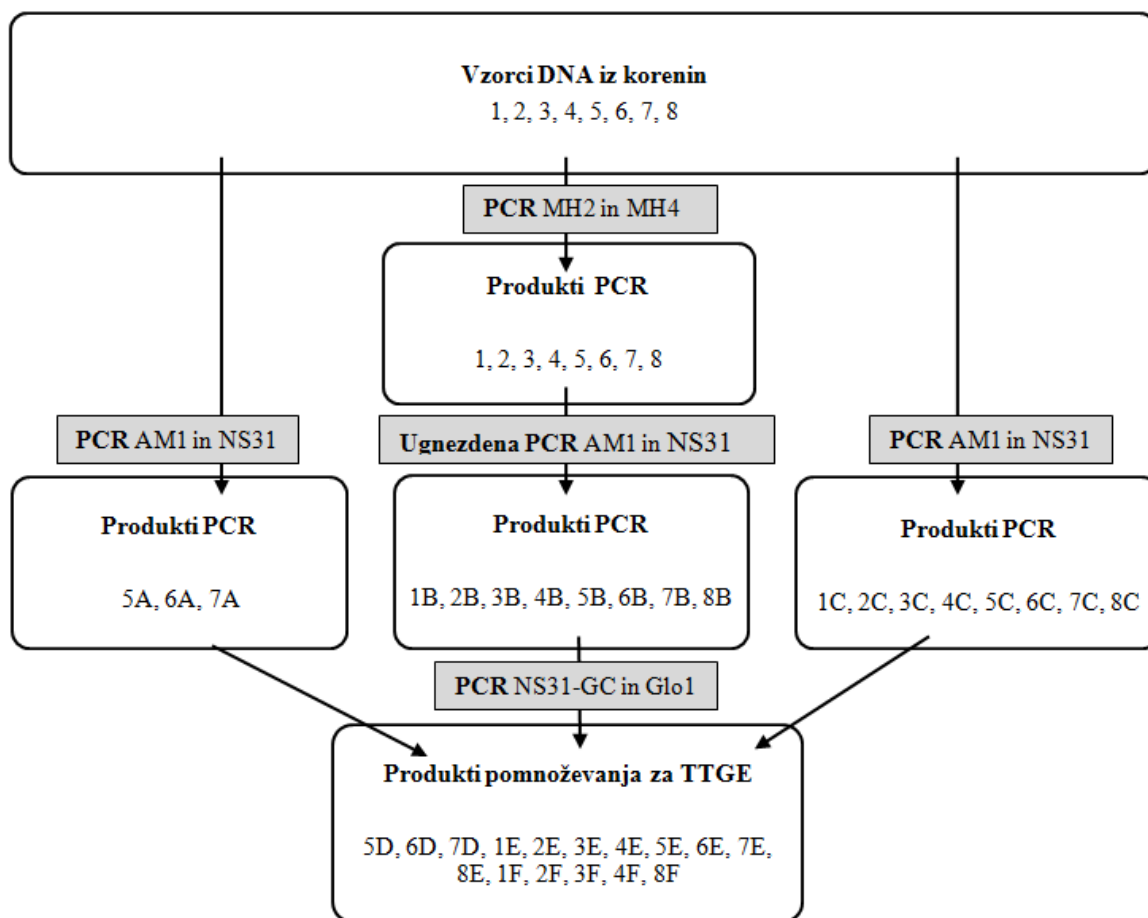
Table 6: Components of the mixture for PCR amplification with NS31-GC and Glo1

Sestavine mešanice	Volumen založne koncentracije za eno reakcijsko mešanico PCR (25 µl)
10 X PCR pufer	2,5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 µl
Začetni oligonukleotid Glo1 (20 pmol/ µl)	0,5 µl
Začetni oligonukleotid NS31-GC (20 pmol/ µl)	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Polimeraza <i>Taq</i> 5 U/ µl)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O (bidestilirana sterilna voda)	14,25 µl
Vzorec (DNA izolat)	5,00 µl

Preglednica 7: Parametri cikla za pomnoževanje DNA - Glo1

Table 7: Cycle parameters for amplification of DNA - Glo1

	T (°C)	T (min:s)	Ponovitev cikla
Začetna denaturacija	95	5:00	1 x
Denaturacija	94	0:45	} 35 x
Vezava začetnih oligonukleotidov	52	0:45	
Elongacija	72	1:00	
Končna elongacija	72	7:00	1 x
Ohranjanje produkta	4	∞	



Slika 1: Shematska predstavitev pomnoževanja in PCR produktov z različnimi začetnimi oligonukleotidi

Figure 1: Schematic representation of the amplification and the PCR products with different primers

#### 4.1.9.4 TTGE

Z metodo TTGE lahko med seboj ločimo vrste AM gliv iz rodu *Glomus* spp. (Cornejo in sod., 2004). Ločevanje je potekalo na poliakrilamidnem gelu na podlagi razlik denaturacijskih lastnosti DNA. TTGE je potekala v kadi sistema TTGE, velikosti približno 6 dm<sup>3</sup>, napolnjeni z 1,5-kratnim pufrom TAE. Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu je potekala med stekloma, vpetima v nosilec, ki smo ga postavili v kad sistema. Celoten sistem smo segreti na 52 °C.

##### 4.1.9.4.1 Priprava gela za analizo TTGE

Priprava poliakrilamidnega gela (Biorad, Kalifornija, ZDA) je potekala v digestoriju. Gel je vseboval 8 % w/v – akrilamid:bisakrilamid - 37,5:1; 8M ureo; 1,5 x TAE puffer (60 mM triacetat, 30 mM očetne kisline, 1,5 mM EDTA, pH 8,3); 0,1% (v/v) TEMED in 0,1 % (w/v) amonijev persulfat (APS).

#### 4.1.9.4.2 Nanos vzorcev

V luknjice gela smo s siringo nanесли od 20 do 40  $\mu\text{l}$  vzorca NS31-GC/Glo 1 produkta (odvisno od koncentracije DNA). Nanesli smo vzorce: 1E, 2F, 3F, 4F, 5D, 6D, 6E, 7D, 7E, 8F in 8E ter standardne vzorce mikoriznih gliv (*Glomus* spp.) in DSE gliv (*Cylindrobasidium* sp. in *Phialophora gregata*). Na sredino ter ob strani gela smo nanесли po 10  $\mu\text{l}$  standarda (lestvica 100 bp). Pred nanosom vzorcev smo luknjice sprali z 1,5-kratnim pufrom. V luknjice ob robu gela smo nanесли barvilo TTGE Blue (Biorad, Kalifornija, ZDA).

#### 4.1.9.4.3 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu

Elektroforeza je potekala na sistemu Dcode<sup>TM</sup> (BioRad, Hercules, CA, ZDA) pri stalni napetosti 70 V, s temperaturnim gradientom od 52 do 59 °C s povišanjem temperature za 0,5 °C/uro. Elektroforeza je potekala 14 ur, z začetno temperaturo 51,8 °C. Po končanem procesu smo poliakrilamidni gel pobarvali z etidijevim bromidom in pod UV-transluminatorjem ocenili fragmente. Po elektroforezi smo gel za 15 minut inkubirali v dH<sub>2</sub>O z 0,5 mg/l etidijevega bromida in ga nato 10 minut izpirali v dH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.9.4.4 Ocena diverzitete gliv na osnovi TTGE profilov

Gel smo fotografirali z UV iluminatorjem s Kodak DC 290 in UV filtrom. Iz fotografije gela smo ocenili mobilnost posameznih fragmentov DNA. Naše vzorce smo primerjali z znanimi vzorci.

#### 4.1.9.4.5 Izolacija DNA iz TTGE gela

Na poliakrilamidnem gelu smo najprej odbrali posamezne močne fragmente DNA z različno mobilnostjo in jih izrezali. DNA smo izolirali tako, da smo izrežanim delčkom gela v mikrocentrifugirki dodali 50  $\mu\text{l}$  vode ddH<sub>2</sub>O (nucleic free) za 30 minut ter vsebino večkrat zamrznili in odmrznili (vsaj 3x). Iz poliakrilamidnega gela izrežanim fragmentom smo v nadaljnjo obdelavo vzorcev za sekvenciranje dodali tudi vzorec 2 (oznaka 2A). 1  $\mu\text{l}$  vzorca smo pomnožili s PCR z NS31 in Glo1 brez GC sponse. Mešanica za pomnoževanje se je od mešanice v preglednici 6 razlikovala v tem, da ni imela – GC sponse. Parametri pomnoževanja so navedeni v preglednici 7. Elektroforeza je potekala na običajnem 1,2 % agaroznem gelu. Fragmente smo izrezali in jih očistili z Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, ZDA).

#### 4.1.9.4.6 Kloniranje

PCR produkte smo po navodilih pGEM-T Easy Vector Systems II (Promega) klonirali z bakterijami *Echerichia coli* sev. JM109 za transformacijo. LB plošče smo pred nanosom bakterij premazali z XGal, izopropil-1-tio- $\beta$ -D-galaktopiranozidom (IPTG) in amplicinom (Sigma). Inkubacija je potekala čez noč na 37 °C.

Izmed belih kolonij smo odvzeli po eno kolonijo, ki je predstavljala en klon in z Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) izolirali plazmide, ki smo jih uporabili za namnožitev PCR (NS31-Glo1/30 ciklov). Po čiščenju s kitom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System je bil produkt pripravljen za sekvenciranje.

#### 4.1.9.4.7 Sekvenciranje

Sekvenciranje je potekalo ob uporabi SP6 ali T7 primerjev in BigDye® terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit na ABI 3730x1 DNA Analyser (Applied Biosystems), Macrogen Company (Macrogen Inc., Seul, Južna Koreja). Dobljene sekvence smo primerjali z razpoložljivimi sekvencami na National Center for Biotechnology Information (NCBI) ob uporabi programa BLAST (Altschul in sod., 1990).

#### 4.1.10 Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi za regijo ITS

##### 4.1.10.1 Odbira vzorcev

Za identifikacijo DSE in nepoznanih koreninskih endofitov smo 14. oktobra 2005 odvzeli 8 novih vzorcev iz tretjega lončnega poskusa (vzorci od 1 do 8) in 4 vzorce izolirane DNA, ki smo jih testirali že na mikorizne glive (vzorci od 9 do 12) iz drugega lončnega poskusa (Preglednica 8). Pri novih vzorcih smo ovrednotili mikoriznost in deleže nepoznanih mikrosklerocijev.

Za določitev DSE in nepoznanih koreninskih endofitov smo izbrali PCR-TTGE tehniko. Izolacija DNA je potekala na enak način kakor pri vzorcih za mikorizne glive (4.1.9.2).

Preglednica 8: Izvor in številka vzorca za molekulsko identifikacijo mikoriznih gliv, DSE in nepoznanih koreninskih endofitov

Table 8: The origin and number of samples for molecular identification of mycorrhizal fungi, DSE and unknown root endophytes

Izvor vzorca		Oznaka	Številka vzorca
Poskus			
III	<i>Brasica juncea</i>	Bj 1	1
III	<i>Eruca sativa</i>	Es 6	2
III	<i>Brasica juncea</i>	Bj 5	3
III	<i>Sinapis alba</i>	Sa 4	4
III	Segrevanje tal	SOL 7	5
III	Kontrola	K2	6
III	<i>Eruca sativa</i>	Es 8	7
III	<i>Sinapis alba</i>	Sa 6	8
II	<i>Eruca sativa</i> + MI	Es + MI 1	9
II	<i>Sinapis alba</i> +MI	Sa + MI 6	10
II	<i>Eruca sativa</i>	Es 6	11
II	<i>Eruca sativa</i>	Es 10	12

##### 4.1.10.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

###### 4.1.10.2.1 PCR I z začetnima oligonukleotidoma ITS 1 f in ITS 4

Za pomnožitev DNA nepoznanih in DSE gliv smo izbrali začetna oligonukleotida ITS 1 f in ITS 4 (Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA). Vključeni so bili direktni produkti DNA vzorcev od 1 do 12 (Preglednica 8). PCR mešanico (Preglednica 9) smo centrifugirali v ohlajeni centrifugi. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 24  $\mu$ l PCR-mešanice in dodali 1  $\mu$ l izolirane DNA. Pomnožitev DNA je potekala v pogojih, ki so navedeni v preglednici 10.

Preglednica 9: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z ITS 1 f in ITS 4

Table 9: Components of the mixture for PCR amplification with ITS 1 f and ITS 4

Sestavine mešanice	Volumen založne koncentracije za eno reakcijsko mešanico PCR (25 $\mu$ l)	
10 X PCR pufer	2,5	$\mu$ l
Mg Cl <sub>2</sub> (25mM)	1,7	$\mu$ l
Začetni oligonukleotid ITS 1f (100 $\mu$ M)	0,375	$\mu$ l
Začetni oligonukleotid ITS 4 (100 $\mu$ M)	0,375	$\mu$ l
dNTP (10 mM)	0,5	$\mu$ l
Polimeraza <i>Taq</i> 5 U/ $\mu$ l)	0,26	$\mu$ l
H <sub>2</sub> O (bidestilirana sterilna voda)	18,79	$\mu$ l
Vzorec (DNA izolat - 100 x razredčen)	1,0	$\mu$ l

Preglednica 10: Parametri cikla za pomnoževanje DNA

Table 10: Cycle parameters for amplification of DNA

	T (°C)	T (min:s)	Ponovitev cikla
Začetna denaturacija	94	0:45	1 x
Denaturacija	93	0:35	} 32 x
Vezava začetnih oligonukleotidov	55	0:53	
Elongacija	72	3:45	
Končna elongacija	72	5:00	1 x
Ohranjanje produkta	4	$\infty$	

#### 4.1.10.2.2 Elektroforeza na agaroznem gelu

Elektroforeza na agaroznem gelu je potekala enako kot pri molekularni identifikaciji mikoriznih gliv (4.1.9.3.3). Velikost lestvice je bila 1000 bp.

#### 4.1.10.2.3 PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 4 in ITS 3 GC

Za pripravo vzorcev za TTGE analizo smo produkte prvega PCR pomnožili še z začetnima oligonukleotidoma ITS 4 in ITS 3 GC (Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA). Mešanica za pomnoževanje je navedena v preglednici 11. Za pomnožitev DNA smo uporabili PCR program (Preglednica 10) za sekvenciranje ekto mikorize. Velikost lestvice je bila 1000 bp.



Preglednica 11: Sestavine mešanice za pomnoževanje PCR z ITS 4 in ITS 3 GC

Table 11: Components of the mixture for PCR amplification with ITS 4 and ITS 3 GC

Sestavine mešanice	Volumen založne koncentracije za eno reakcijsko mešanico PCR (25 µl)
10 X PCR pufer	2,5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> (25mM)	2,5 µl
Začetni oligonukleotid ITS 4 (50 µM)	0,25 µl
Začetni oligonukleotid ITS 3 GC (18 µM)	0,69 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Polimeraza <i>Taq</i> 5 U/ µl)	0,15 µl
H <sub>2</sub> O (bidestilirana sterilna voda)	5,91 µl
Vzorec (DNA izolat - 100 x razredčen)	12,5 µl

#### 4.1.10.3 TTGE

Vsi postopki priprave gela za analizo TTGE, nanos vzorcev in potek elektroforeze so potekali enako kot pri molekularni identifikaciji mikoriznih gliv (4.1.9.4).

##### 4.1.10.3.1 Izolacija DNA iz TTGE gela

Izrez fragmentov je potekal na enak način kot pri mikoriznih glivah. Mešanica za pomnoževanje je bila enaka mešanici v preglednici 9, z ozjemo začetnih oligonukleotidov ITS 4 in ITS 3. Za pomnožitev DNA smo uporabili PCR program v preglednici 10. Velikost lestvice je bila 1000 bp.

##### 4.1.10.3.2 Kloniranje in sekvenciranje

Postopki kloniranja in sekvenciranja so potekali enako kot pri mikoriznih glivah (4.1.9.4.6 in 4.1.9.4.7).

## **4.2 Poljski poskus**

### **4.2.1 Zasnova poskusa**

Poljski poskus je bil zasnovan v treh blokih z 10 obravnavanji. V vsakem obravnavanju je bilo posajenih po 10 rastlin. Zaradi strojne priprave tal je vsak greben predstavljal en blok. Med posameznimi obravnavanji je bil 1 m širok izolacijski pas, ki je preprečeval mešanje vplivov posameznih obravnavanj.

### **4.2.2 Lastnosti tal pred obdelavo**

Poljski poskus je potekal v poskusnem nasadu Kmetijskega inštituta Slovenije v delu nasada, namenjenem kolekcioniranju in preizkušanju jagodičja. Površina, na kateri je potekal poskus je bila predhodno zasajena z malinami. Tla so srednje težka, teksturni razred meljasta ilovica (MI), sestavljena iz 24,2 % gline, 18,9 % grobega melja, 48,1 % finega melja in 8,8 % peska. Organske snovi je bilo v tleh, 3,4 %; pH je bil za rast jagod optimalen, 6,0. Založenost s hranili je bila nesorazmerna. Kalija in dušika je bilo veliko ( $K_2O$  - 25,9 mg/100 g tal; dušik - 0,27 %); fosforja pa malo ( $P_2O_5$  - 4,1 mg/100 g tal). Organska snov je bila analizirana po metodi ISO 14235:1998, pH z ISO 10390:2005, skupen dušik z ISO 11261:1995 ter P in K po AL-metodi (Egner in sod., 1960).

V poljskem poskusu smo na  $m^2$  tal vnesli 4,1 kg Bj, 2,3 kg Sa, 3,2 kg Es in 5,7 kg Vf. Vnesena količina organske snovi posameznih rastlin se je razlikovala zaradi bujnosti rasti posameznih rastlin in setvenih razdalj. Zaradi različne mase in različnih vsebnosti GSL v posameznih rastlinah smo v zemljo na  $m^2$  pri obravnavanju Bj vnesli povprečno 18 mg GSL na kg zemlje, pri obravnavanju Sa 23,5 mg in pri obravnavanju Es 8,3 mg GSL. Skupna količina v tla ali substrate vnesenih GSL je bila izračunana na osnovi analize GSL (Priloga A, Priloga B). Z Vf v tla nismo vnesli GSL ampak le organsko snov.

### **4.2.3 Načini obdelave tal za posamezna obravnavanja**

Za zeleni podor oz. biofumigacijo smo sejali biocidne rastline (trjava gorjušica, bela gorjušica in navadna rukvica) in nebiocidno rastlino drobnoplodni krmni bob. Solarizacijo smo izvajali z dvema vrstama folij v dveh trajanjih solarizacije. Alternativne metode smo primerjali s kontrolo in kemičnim razkuževanjem z dazometom. Načini obdelave tal, obravnavanja in oznake obravnavanj v poljskem poskusu so navedeni v preglednici 12.

S pripravljalnimi deli za sajenje smo začeli 10. julija. Biocidne rastline na posameznih parcelicah smo zmulčili z mulčerjem kladivarjem in jih plitvo zaorali v tla. Neposredno po frezanju smo oblikovali grebene in jih prekrili s črno PE folijo z že izrezanimi sadilnimi mesti (0,25 m x 0,25 m).

Preglednica 12: Načini obdelave tal, obravnavanja v poljskem poskusu in oznake obravnavanj

Table 12: Methods of soil cultivating, treatments and tags of treatments in the field experiment

Načini obdelave tal	Obravnavanje	Oznaka obravnavanja
Biocidne rastline za podor	<i>Brassica juncea</i> / rjava gorjušica / sorta Negro Caballo	Bj
	<i>Sinapis alba</i> / bela gorjušica / sorta Asta	Sa
	<i>Eruca sativa</i> / navadna rukvica	Es
Rastline za zeleno gnojenje	<i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> / Drobnoplodni krmni bob / sorta Gloria	Vf
Solarizacija	Prozorna PE folija – prekrivanje 6 tednov	SOL PF 6
	Prozorna PE folija – prekrivanje 9 tednov	SOL PF 9
	Črna PE folija – prekrivanje 6 tednov	SOL ČF 6
	Črna PE folija – prekrivanje 9 tednov	SOL ČF 9
Kemično razkuževanje	Dazomet / Basamid	D
Neobdelana površina	Kontrola	K

#### 4.2.3.1 Biocidne rastline

Poskusne parcele za obravnavanja z rastlinami za podor (biocidne rastline in rastlina za zeleno gnojenje) smo preorali in 22. aprila 2002 zasejali z rjavo in belo gorjušico (gostota setve 50 rastlin/m<sup>2</sup>), z navadno rukvico 23. aprila 2002 (70 rastlin/m<sup>2</sup>) in drobnoplodnim krmnim bobom 3. aprila 2002 (50 rastlin/m<sup>2</sup>).

Maso vdelenih biocidnih rastlin smo ovrednotili tako, da smo iz vsake parcele pred obdelavo odvzeli 10 naključno odbranih rastlin in jim izmerili maso ter pomnožili s številom posejanih rastlin. S tem smo dobili okvirno maso rastlin, ki je bila vdeleni v tla. Pri izračunu smo upoštevali 20 % izpad rastlin zaradi suše, škodljivcev in bolezni.

#### 4.2.3.2 Solarizacija

Solarizacijo smo izvedli z dvema različnima folijama. V poskus sta bili vključeni črna PE folija PE 6000\*0.15, debeline 0,3 mm in prozorna PE folija UV 6000\* 0.15 (UV 2002), debeline 0,3 mm. Folije, ki so tla prekrivale 9 tednov, smo položili 10. maja 2002, folije, ki so tla prekrivale 6 tednov, pa 30. maja 2002.

Pred polaganjem folij smo na poskusne parcelice, ki so bile pozneje prekrivane s folijami, v globino 10 in 20 cm, vkopali sonde za meritve temperature tal. Meritve, ki smo jih izvajali z merilno napravo Data- T Logger DL2e (Delta-T Devices LTD, VB), so potekale na vsake pol ure.

Prozorna in črna folija sta v primerjavi s kontrolno, neprekrivno parcelo, vplivali na izrazit dvig temperature tal na globini 10 in 20 cm (Priloga D). Povprečna dnevna temperatura tal pod prozorno folijo je bila za približno 2°C višja kot pod črno folijo (Priloga D-3). Razlike v temperaturi med kontrolno in solariziranimi parcelama so bile od 5,9 do 8,3 °C. Zaradi poškodbe kabla sonde za meritve temperature na globini 10 cm, je bila pri kontroli možna primerjava le s temperaturo tal na globini 20 cm. Najvišja dosežena temperatura tal pod

prozorno folijo je bila 39,8 °C. V celem obdobju solarizacije je bila kritična temperatura tal (37 °C) presežena le pod prozorno folijo, in sicer na globini 10 cm. Temperatura se je nad kritično mejo pri 9 tedenskem pokrivanju dvignila v 6 dneh (170 ur) in v 6 tedenskem prekrivanju le v 3 dneh (80 ur). Za doseganje pravega učinka razkuževanja tal s solarizacijo je bilo izrazito premalo visokih temperatur (Rosati, 2002).

Nihanje temperature pod folijami je bilo neposredno vezano na nihanje temperature zraka. Temperatura tal pod folijami je bila v vsem obdobju prekrivanja višja kot temperatura zraka. Iz krajšega obdobja delovanja merilne sonde na kontrolni, nepokriti parceli na globini 10 cm lahko ugotovimo, da je bila temperatura nepokritih tal v istem obdobju nižja kot temperatura zraka. Na globini 20 cm so bila nihanja prav tako vezana na temperaturo zraka. Pod prozorno folijo je bila temperatura višja kot temperatura zraka, pod črno folijo pa približno enaka kot temperatura zraka. Na kontrolni parceli je bila temperatura tal izrazito nižja od solariziranih parcel in temperature zraka.

#### **4.2.3.3 Kemično razkuževanje tal**

Kemično razkuževanje tal smo izvedli s sredstvom dazomet (Basamid<sup>®</sup>, BASF, AG, Nemčija), 7 tednov pred predvidenim sajenjem jagod (30. maja). Vsako poskusno parcelo smo okopali in jo posuli s 50 g dazometna na m<sup>2</sup>. Sredstvo smo plitvo vkopali in parcele prekrili s črno PE folijo. Parcele smo odkrili 14. junija 2002, dva tedna po tretiranju. Po odstranjanju folij so tla 5 tednov mirovala.

#### **4.2.3.4 Kontrola**

Kontrolne parcelice so bile po oranju in frezanju prepuščene naravnemu zaraščanju. Prvič smo jih pokosili 11. junija 2002. Košnjo smo do sajenja ponovili še dvakrat.

#### **4.2.4 Sadilni material in sajenje**

V poljskem poskusu smo sadili hlajene (frigo) sadike sorte 'Marmolada', uvožene iz Italije (Mazzoni). Sadike so bile po kakovosti izenačene in zdrave. Poskus smo posadili 22. julija 2002, 12 dni po pripravi zemljišča (zaoravanje biocidnih rastlin, odstranitev folij v obravnavanih solarizacije, polaganje folij za sajenje jagod). Po sajenju smo sadike dva tedna večkrat dnevno oroševali.

#### **4.2.5 Spremljanje parametrov rasti in razvoja jagod**

V poljskem poskusu smo rast jagod ovrednotili s štejetjem listov in oceno intenzivnosti rasti rastlin. Intenzivnost rasti jagod je zaradi možne prisotnosti bolezni ali različnih zunanjih dejavnikov težko izraziti samo s številom listov. Veliko število majhnih listov ni nujno pokazatelj vitalnosti in potencialno visoke rodnosti, ampak obratno. Liste smo prešteli 3 mesece po sajenju (14. oktober 2002).

V drugi polovici avgusta so na rastlinah začele intenzivno izraščati živice, ki smo jih redno odstranjevali. Pred vsako rezjo smo živice prešteli. Ukrep je potekal do zaključka izraščanja živic.

#### 4.2.6 Spremljanje parametrov rodnosti

Masa pridelka je najbolj celovit podatek o uspešnosti rasti določene rastline. V poskusu smo merili skupno maso pridelka desetih rastlin v vsakem obravnavanju. Pridelek smo, odvisno od intenzivnosti zorenja, obirali na dva do tri dni. Zorenje v prvem rodnem letu je potekalo od 19. maja 2003 do 20. junija 2003, v drugem pa od 1. junija 2004 do 5. julija 2004. V obeh letih smo obrali celoten pridelek in ne samo tržnih plodov. V prvem letu smo plodove tehtali (Tehtnica Exacta 2200 EB) in šteli. V drugem letu smo spremljali le skupno maso pridelka desetih rastlin na obravnavanje.

#### 4.2.7 Zapleveljenost

Po sajenju so v poljskem poskusu zaradi pogostega oroševanja in deževnega poletja iz sadilnih mest ob sadikah močno izraščali pleveli. Prvo pleveli smo opravili 9. avgusta 2002, 18 dni po sajenju in 13. septembra 2002, 53 dni po sajenju. Pred pleveli smo pleveli prešteli. Razdelili smo jih v tri skupine, ki so jih predstavljali širokolistni pleveli, slak in ozkolistni pleveli oz. trave. Med širokolistnimi pleveli so prevladovali veliki trpotec (*Plantago major*), navadna zvezdica (*Stellaria media*) in poljski jetičnik (*Veronica arvensis*). V rezultatih so pleveli prikazani skupaj (ozkolistni in širokolistni).

#### 4.2.8 Ocenjevanje parametrov mikorizne in nemikorizne kolonizacije

Vzorci korenin smo odvzeli v obdobju od 12. do 14. tedna po sajenju. Korenine smo odvzeli z nožem za odstranjevanje peščišča jabolok. Odvzeti vzorec korenin smo prelili z Blesovim fiksativom (Glej poglavje 4.1.8.1). V vsakem obravnavanju smo korenine odvzeli pri 5 rastlinah.

Postopki barvanja in vrednotenja stopnje mikoriznosti so bili opravljeni na enak način kakor v lončnih poskusih (Glej poglavje 4.1.8.2).

Prisotnost AM in DSE gliv oz. nepoznanih koreninskih endofitov smo ovrednotili na enak način kot v lončnih poskusih (Glej poglavje od 4.1.8.4 do 4.1.8.6).

#### 4.3 Obdelava podatkov

Podatke mikorizne kolonizacije, rasti in rodnosti ter zapleveljenosti smo statistično obdelali z enofaktorsko ali večfaktorsko analizo variance (ANOVA). Obravnavanja smo med seboj primerjali z Duncanovim primerjalnim testom pri ( $p \leq 0,05$ ). Parametre kolonizacije korenin z AM in DSE smo ovrednotili s programom MycoCalc (Trouvelot in sod., 1986). Za primerjavo med parametri rasti in rodnosti ter mikorizno kolonizacijo smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije. Podatke smo statistično obdelali s programom STATGRAPHICS Centurion XV.II (StatPoit, Inc., 2006).

## 5 REZULTATI

Rezultati so predstavljeni ločeno za lončne (5.1) in poljski poskus (5.2). Podana je neposredna primerjava med posameznimi lončnimi poskusi in posredna primerjava s poljskim poskusom (5.3). Delovanje alternativnih metod razkuževanja tal smo spremljali z meritvami parametrov rasti in rodnosti jagod, zapleveljenostjo, analizami kemijskih lastnosti zemlje in substratov, mikorizno kolonizacijo ter kolonizacijo z DSE in nepoznanimi koreniskimi endofiti.

### 5.1 Lončni poskusi

#### 5.1.1 Lastnosti zemlje in substratov oz. mešanic zemlje pred in po poskusu

Lastnosti zemlje in substratov oz. mešanic zemlje v lončnih poskusih so se, v primerjavi z osnovno sestavino substratov (zemljo), po biofumigaciji in solarizaciji spremenile. Z navedenima ukrepoma smo vplivali na strukturo ter na mikrobiološko in kemično sestavo substratov. Mikrobiološko aktivnost substratov smo v naših poskusih ovrednotili z mikorizno in DSE kolonizacijo jagod. Kemične spremembe smo ovrednotili z analizo odvzetih vzorcev substratov. Spremembe so se posredno izrazile v rasti in pridelku jagod.

Po obiranju pridelka smo analizirali vzorce zemlje oz. substratov iz obravnavanj brez dodanega MI (mikorizni inokulum) in jih primerjali med seboj ter z osnovnim vzorcem zemlje iz katerega so bili substrati narejeni. V substratih smo analizirali pH vrednost, dostopni P in K, skupni N in organsko snov (Preglednica 13). Iz analize je razvidno, da se je kislost v primerjavi s kontrolo ob zaključku poskusa statistično značilno povečala v obravnavanjih SOL in D in zmanjšala v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami. Količina dostopnega fosforja je bila po zaključenem poskusu v vseh obravnavanjih večja kot v zemlji pred začetkom poskusa.

Preglednica 13: Kemična analiza zemlje za substrate in analiza substratov iz LP II po zaključenem poskusu

Table 13: Chemical analysis of soil for the of substrate and analysis of substrates from the LP II and after the experiment

Obravnavanje	pH	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100 g zemlje)	K <sub>2</sub> O (mg/100 g zemlje)	Skupni N (%)	Organska snov (%)
Pred poskusom	6,0 ± 0,3	4,1 ± 0,1	25,9 ± 0,1	0,27 ± 0,01	3,4 ± 0,1
Po poskusu					
Bj	5,9 ± 0,1 b	7,9 ± 0,1 c	29,0 ± 0,3 a	0,28 ± 0,01 ab	5,6 ± 0,1 b
Sa	6,2 ± 0,1 a	11,0 ± 0,1 a	25,0 ± 0,7 b	0,30 ± 0,00 a	6,3 ± 0,1 a
Es	5,8 ± 0,1 bc	11,0 ± 0,1 a	25,0 ± 0,3 b	0,27 ± 0,01 b	5,3 ± 0,1 c
SOL	5,2 ± 0,1 d	6,9 ± 0,3 d	10,0 ± 0,5 d	0,25 ± 0,00 b	4,1 ± 0,1 e
D	5,1 ± 0,0 d	5,8 ± 0,1 e	7,5 ± 0,1 e	0,25 ± 0,00 b	4,3 ± 0,1 e
K	5,5 ± 0,1 c	8,4 ± 0,1 b	13,0 ± 0,1 c	0,25 ± 0,01 b	4,8 ± 0,1 d

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Dostopni P ( $P_2O_5$ ) je bil v obravnavanjih z biocidnima rastlinama Sa in Es statistično značilno večji od kontrole in ostalih obravnavanj, kar je bilo za rast jagod ugodno. Obravnavanja z biocidnimi rastlinami so se statistično značilno razlikovala od ostalih obravnavanj tudi v vsebnosti kalija ( $K_2O$ ). V količini skupnega N razlik med obravnavanji ni bilo. Organska snov se je v primerjavi z osnovno izhodiščno zemljo v vseh substratih povečala. Kljub temu, da je bilo v lončnem poskusu vsem rastlinam dodana enaka količina biocidnih rastlin je bilo med obravnavanji največ organske snovi v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami, predvsem v obravnavanju Sa. Organska snov se je povečala tudi v kontroli.

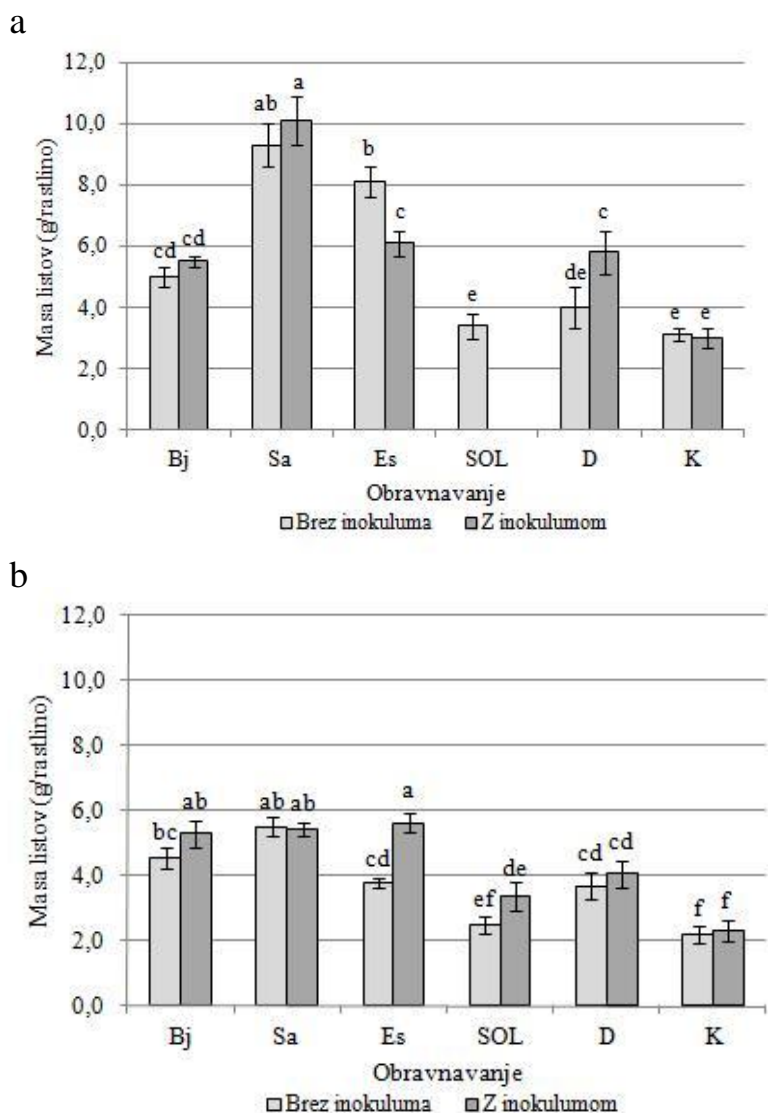
## **5.1.2 Vpliv alternativnih metod razkuževanja na parametre rasti in rodnosti jagod**

### **5.1.2.1 Intenzivnost rasti jagod**

Intenzivnost rasti jagod smo v lončnih poskusih ovrednotili z maso svežih listov, ki rastni potencial ustrezneje ovrednoti kot število listov. V primeru nekaterih glivičnih ali virusnih bolezni se namreč število listov izredno poveča, listna površina pa zmanjša (Mass, 1998). V takem primeru bi nam število listov dalo nerealen podatek.

V prvem lončnem poskusu (LP I), v povprečju med obravnavanji, ki smo jim dodali MI in obravnavanji brez MI, v masi listov ni bilo statistično značilnih razlik (Priloga H). V drugem lončnem poskusu (LP II) so bile razlike statistično značilne (Priloga I). Med posameznimi obravnavanji so bile razlike v obeh lončnih poskusih statistično značilno različne (Slika 2). V obeh poskusih so izstopala obravnavanja z biocidnimi rastlinami v primerjavi s solarizacijo (SOL) in dazometom (D) ter kontrolo (K). Masa listov v LP I se je od poskusa v LP II bistveno razlikovala pri obravnavanjih *Sinapis alba* (Sa) in *Eruca sativa* (Es) z in brez MI. Ostala obravnavanja z in brez MI so bila med letoma primerljiva. Edina izjema je bilo obravnavanje Es v LP I, ki je imelo manjšo listno maso ob dodatku MI. V vseh ostalih obravnavanjih so imela obravnavanja z dodanim MI večjo ali enako listno maso kot obravnavanja brez MI.

Rezultati v LP III (Preglednica 14) so se v masi listov močno razlikovali od prvih dveh poskusov. Masa listov v obravnavanju brez MI je bila v povprečju za 41 % večja od mase v enakih obravnavanjih v LP I in še enkrat večja od LP II. Obravnavanja z biocidnimi rastlinami so se statistično značilno razlikovala od obravnavanj brez dodane organske snovi (SOL, D in K).



Slika 2: Povprečna masa listov na rastlino v LP I (a) in LP II (b)  
 Stolpec prikazuje povprečje ± SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga H in I)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 2: The mass of leaves per plant in the LP I (a) and LP II (b)  
 Column shows the mean ± SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex H nd I)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)



Preglednica 14: Masa listov na rastlino v LP III

Table 14: The mass of leaves per plant in LP III

Obravnavanje	Masa listov g/rastlino	
Bj	10,3 ± 0,5	a
Sa	10,7 ± 1,3	a
Es	10,6 ± 0,6	a
SOL	4,4 ± 0,2	b
D	5,7 ± 0,2	b
K	4,7 ± 0,1	b

Stolpec prikazuje povprečje ± SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Column shows the mean ± SE. The values marked with a different letter are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test)

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)

V poskusih smo poleg intenzivnosti rasti spremljali tudi odmiranje rastlin. V LP I je v obravnavanju D odmrila ena rastlina, v obravnavanju D+MI pa 7, kar je 50 % rastlin.

V LP II so v obravnavanju D odmrle 4 rastline, v D+MI pa ena. V obravnavanjih Bj in BJ+MI je odmrila po ena rastlina.

V LP III je v obravnavanju Sa odmrila ena rastlina. Vzroki odmrtja rastlin v poskusih niso bili pojasnjeni.

### 5.1.2.2 Rodnost jagod

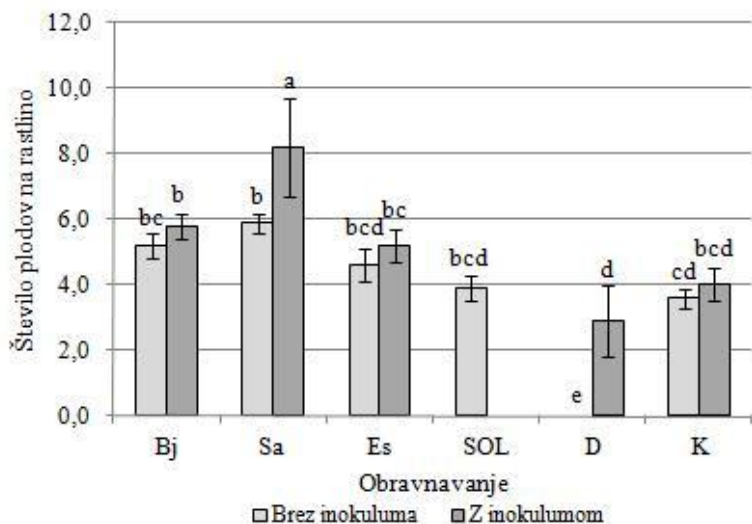
Rodnost jagod smo ovrednotili na podlagi števila plodov. Masa plodov bi v naših lončnih poskusih, zaradi slabih oprasevalnih pogojev v rastlinjaku, predstavljala nerealen podatek. Povprečna rodnost jagod je bila, glede na to ali smo obravnavanjem dodali MI ali ne, v LP I statistično značilno večja v obravnavanjih z dodanim MI (Priloga H). Število plodov v obravnavanjih z MI je bilo v povprečju za 35 % večje od števila plodov v obravnavanjih brez MI. V LP II razlike niso bile statistično značilne (Priloga I).

V prvem lončnem poskusu je bil pridelek v obravnavanjih brez MI v vseh obravnavanjih, razen D, zelo izenačen (Slika 3). Ob dodanem MI sta se od ostalih statistično značilno razlikovali le obravnavanji Sa z izrazito velikim številom plodov in D brez pridelka.

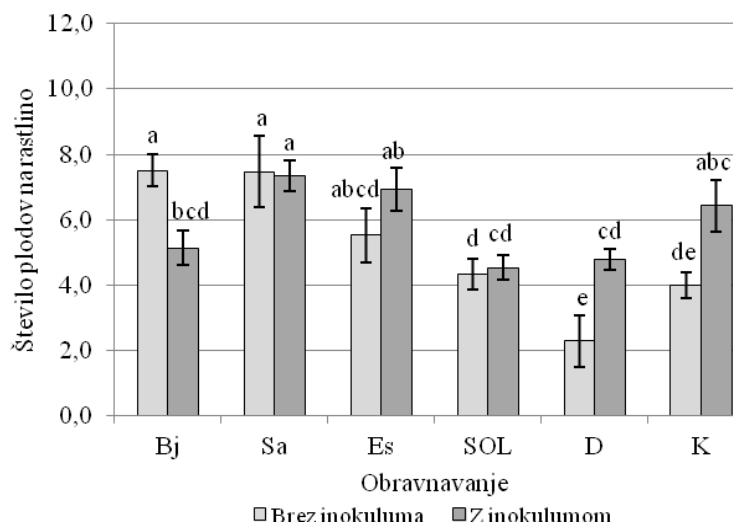
V LP II so bile razlike v pridelku med obravnavanji majhne. Največji pridelek so dosegle rastline iz obravnavanj z biocidnimi rastlinami. Odstopale so predvsem v razmerju do obravnavanja D. Pridelek rastlin z dodanimi biocidnimi rastlinami je bil večji od ostalih dveh obravnavanj in kontrole.

V LP III (Preglednica 15), je bil pridelek podoben pridelku v LP II brez dodanega MI.

a



b



Slika 3: Povprečno število plodov na rastlino v LP I (a) in LP II (b)

Stolpec prikazuje povprečje  $\pm$  SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga H in I)

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 3: The number of fruits per plant in the LP I (a) and LP II (b)

Column shows the mean  $\pm$  SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex H and I)

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)

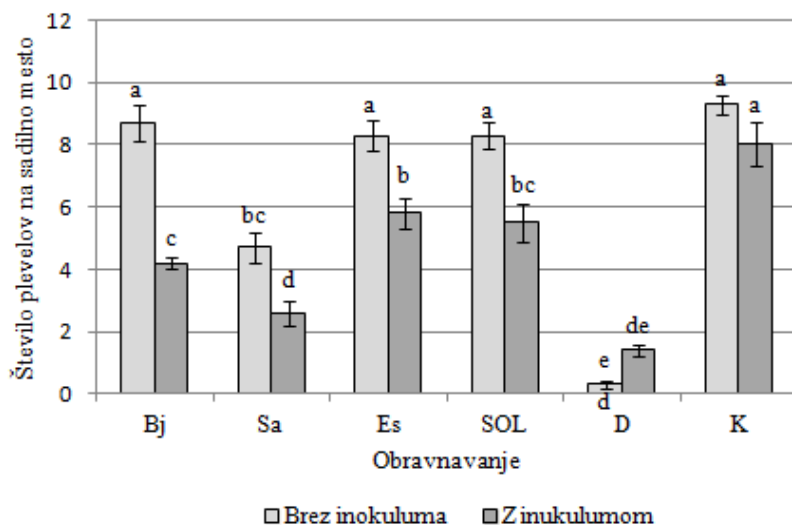
Preglednica 15: Število plodov na rastlino v LP III

Table 15: The number of fruits per plant in LP III

Obravnavanje	Število plodov na rastlino
Bj	8,1 ± 1,2 ab
Sa	6,5 ± 0,8 bc
Es	8,9 ± 0,7 a
SOL	4,0 ± 0,5 d
D	5,1 ± 0,3 cd
K	3,3 ± 0,3 d

### 5.1.3 Vpliv alternativnih metod razkuževanja tal na prisotnost plevelnih rastlin

V lončnih poskusih smo pričakovali večjo zapleveljenost rastlin v obravnavanjih z dodanim MI, ki je bil vzgojen v zemlji iz ekološkega nasada jagod. Rezultati skupnega števila plevelnih rastlin v LP I in LP II nam tega niso potrdili (Slika 4).



Slika 4: Povprečno število plevelov na sadilno mesto v LP I in LP II  
 Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga J)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 4: The number of weeds in the planting site in LP I and LP II  
 Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex J)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)

Število plevelov, izraslih v substratih z dodanim mikoriznim inokulumom, je bilo v vseh obravnavanjih, razen kontroli, manjše od števila plevelov v substratih brez mikoriznega inokuluma.

V vseh treh lončnih poskusih so bile razlike med posameznimi obravnavanji izrazite (Priloga J). Ugotovili smo, da je v vseh treh lončnih poskusih, poleg D najbolj zaviralno na rast plevelov delovala biocidna rastlina Sa. Največja zapleveljenost je bila pričakovano v kontroli, najmanjša v obravnavanjih D, ne glede na to, ali je bil substratu dodan MI ali ne. SOL se je približala delovanju biocidnih rastlin Bj in Es. V LP III v zapleveljenosti ni bilo statistično značilnih razlik, razen med D in vsemi ostalimi obravnavanji.

#### **5.1.4 Mikorizna in nemikorizna kolonizacija korenin jagod**

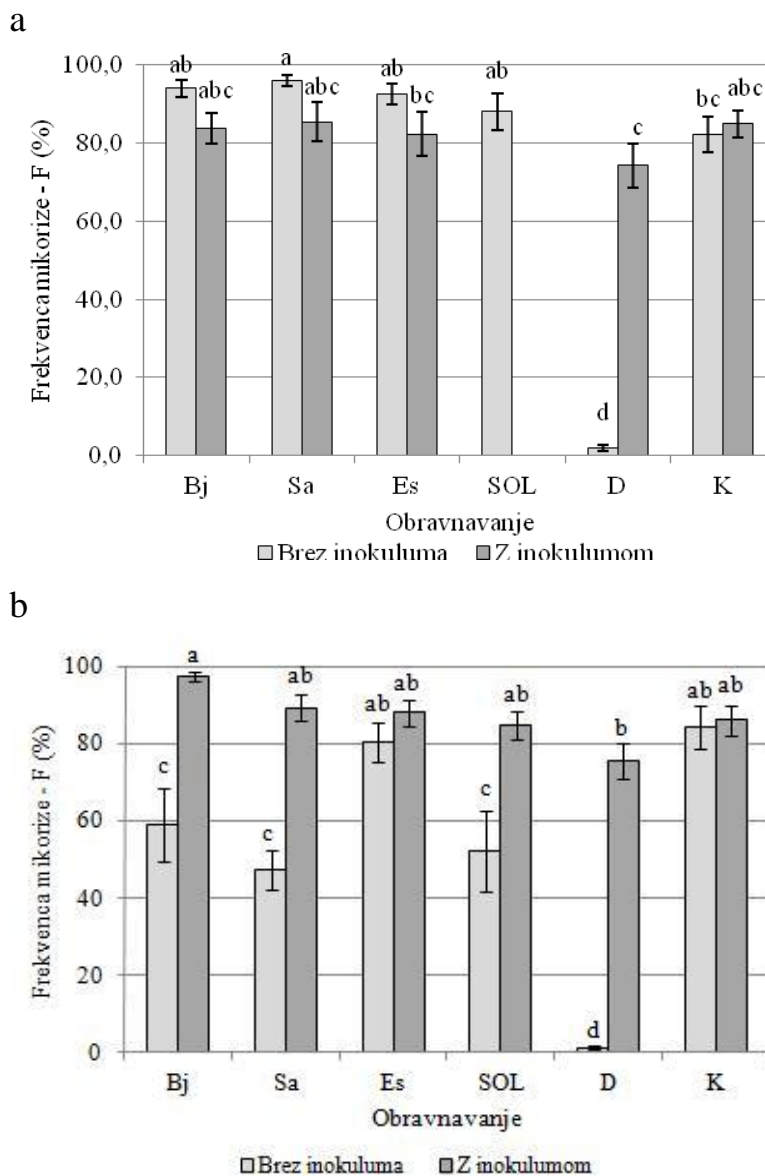
##### **5.1.4.1 Frekvenca mikorize (F%)**

Frekvenca mikorize rastlin iz LP I in LP II se je razlikovala od F% rastlin iz LP III (Slika 5; Priloga O, P in R). V povprečju so bile vrednosti F% v prvih dveh poskusih mnogo večje.

V LP I sta se povprečni vrednosti F% v obravnavanjih z ali brez MI med seboj statistično razlikovali. Med posameznimi obravnavanji z in brez MI, razen pri kemičnem razkuževanju z dazometom, so bile razlike statistično neznačilne. Tudi razlike med obravnavanji, razen v primerjavi z dazometom, niso bile statistično značilne. Razlik ni bilo tudi v primerjavi s kontrolo (Slika 5a).

V LP II so bile razlike med obravnavanji z in brez MI večje. Pri Bj, Sa, SOL in D so bile statistično značilne. V obravnavanjih Es in kontroli razlike niso bile značilne. Med obravnavanji so bile razlike velike predvsem v primerjavi z obravnavanjem D. V obravnavanjih brez MI, je od ostalih obravnavanj statistično značilno odstopalo obravnavanje Es, ki je bilo enako kontroli. Ob dodatku mikoriznega inokuluma se je F% pri vseh oblikah razkuževanja (biofumigacija, solarizacija in kemično razkuževanje), izenačila s kontrolo.

V LP III se je obravnavanje Es statistično razlikovalo od SOL, D in kontrole (Priloga R).

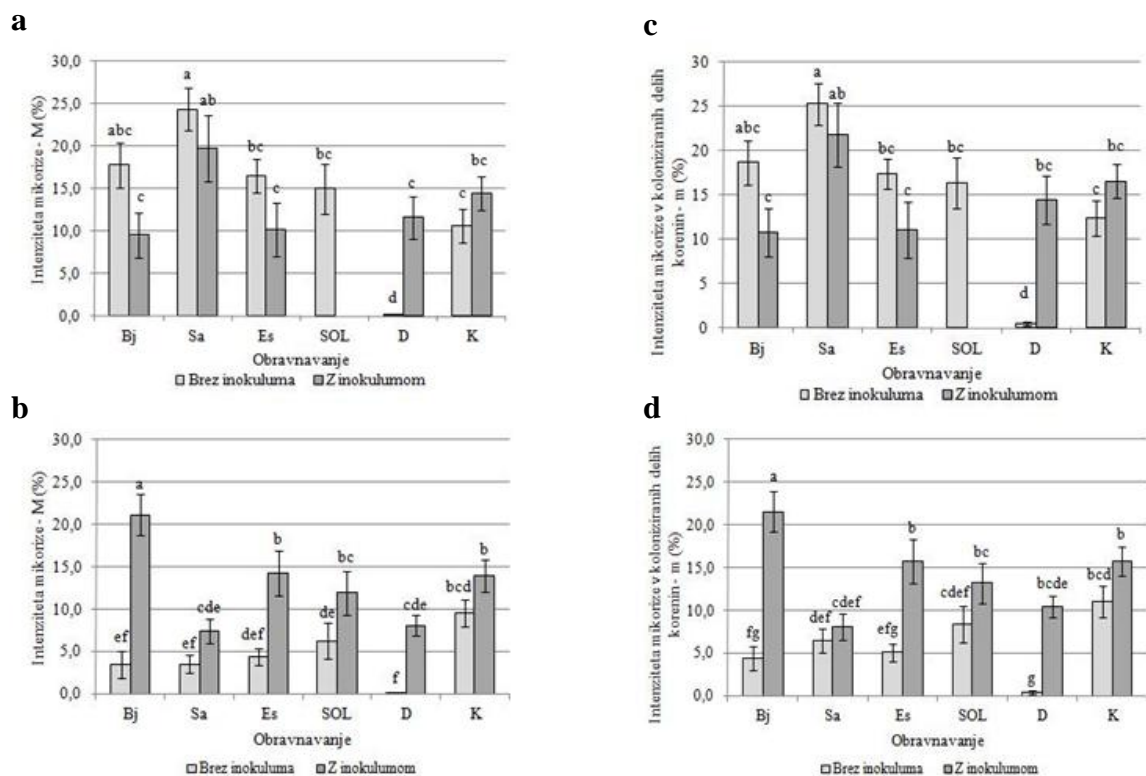


Slika 5: Frekvenca mikorize (F%) v LP I (a) in LP II (b)  
 Stolpec prikazuje povprečje ± SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga O in P)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 5: Frequency of mycorrhiza (F%) in the LP I (a) and LP II (b)  
 Column shows the mean ± SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex O and P)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)

### 5.1.4.2 Intenziteta mikorize (M%) in intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%)

Intenziteta mikorize (M%) (Slika 6a, 6b) in intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%) (Slika 6c, 6d) sta bili v LP I in LP II skoraj izenačeni. Med lončnimi poskusi sta se vrednosti razlikovali. V LP I in LP II sta bili kar nekajkrat večji od vrednosti v LP III (Priloga R).



Slika 6: Intenziteta mikorize (M%) v LP I (a) in LP II (b) in intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%) v LP I (c) in LP II (d)  
 Stolpec prikazuje povprečje ± SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga O in P)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 6: Intensity of mycorrhization (M%) in the LP I (a) and LP II (b) and intensity of mycorrhization in colonized part of the roots (m%) in the LP I (c) and LP II (d)  
 Column shows the mean ± SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex O and P)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)

V LP I, v obravnavanjih brez dodanega inokuluma, sta bili M% in m% največji v obravnavanju Sa (Slika 6a, 6c). Statistično se je razlikovalo od vseh ostalih obravnavanj, razen Bj. V obravnavanjih z dodanim MI je v LP I največjo vrednost prav tako dosegla Sa, ki se v M% statistično ni razlikovala le od kontrole, v m% pa od kontrole in D. V obravnavanju D brez dodanega MI so bile korenine jagod popolnoma nekolonizirane. Ob

dodanem MI, se je intenziteta mikorize v obeh poskusih izrazito povečala. Kontrolni z in brez MI sta bili v LP I in LP II skoraj popolnoma enaki (Slika 6b, 6d).

V LP II sta bili največji vrednosti M% in m% doseženi v obravnavanju Bj+MI. Obravnavanja brez MI so bila med seboj in s kontrolo izenačena.

V LP III med obravnavanji ni bilo razlik v M%. V vrednosti m% so bile razlike statistično značilne med Es in D (Priloga R).

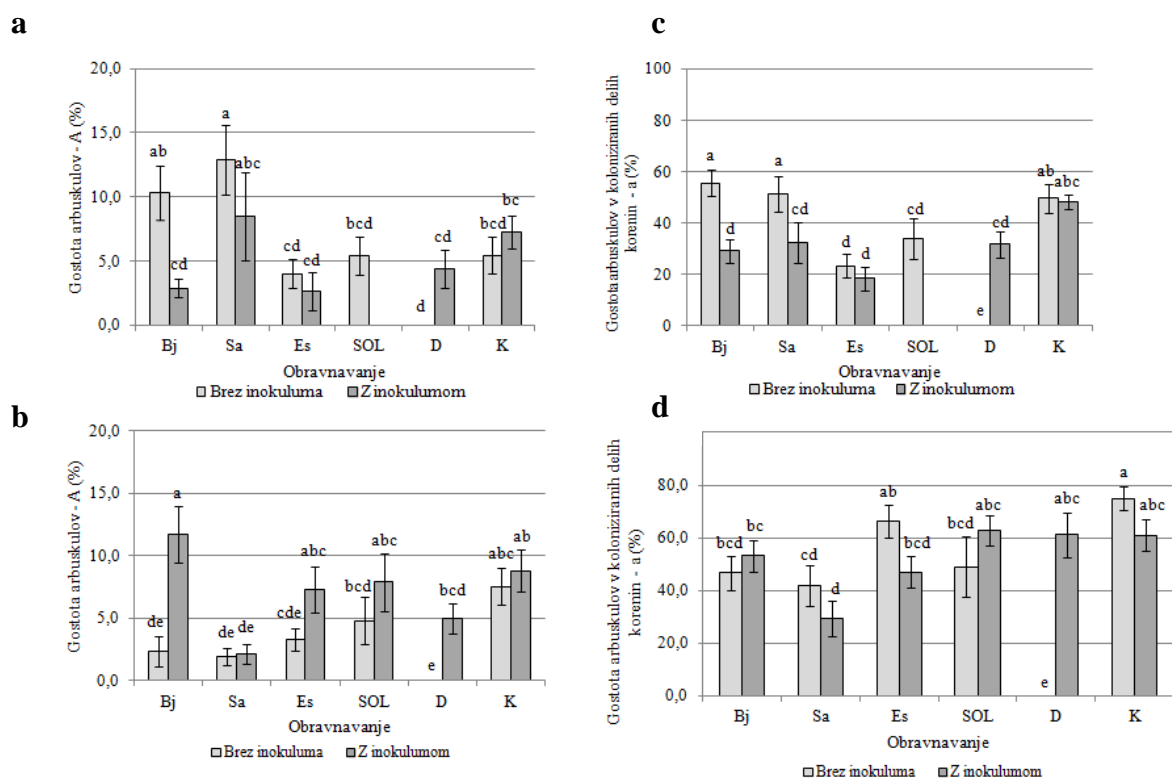
#### **5.1.4.3 Gostota arbuskulov (A%) in gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%)**

Gostota arbuskulov (A%) in gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%) sta se med posameznimi lončnimi poskusi razlikovali. V povprečju so bile vrednosti A% dosežene v LP I in LP II večje od vrednosti v LP III (Priloge O, P, R).

V LP I sta bili A% in a% ob dodanem MI pri biocidnih rastlinah manjši kot v obravnavanjih brez dodanega MI (Slika 7a, 7c). V obravnavanju D je bila gostota arbuskulov ob dodanem MI večja. Največja A% in a% sta bili doseženi v obravnavanjih Bj in Sa. V kontroli se vrednost a% ni razlikovala od najvišjih vrednosti. Vrednost a% je bila v obravnavanju D enaka nič, z dodanim MI pa je bila dokaj velika.

Velika gostota arbuskulov je bila dosežena tudi v obravnavanju Bj+MI v LP II (Slika 7b, 7d), vendar se od ostalih obravnavanj z MI, razen od Sa in D, ni statistično razlikovala. V LP I in LP II so bile rastline v obravnavanju D minimalno kolonizirane, zato je bila vrednost A% nič, ob dodatku MI pa le 4,4 in 5 %. Vpliv solarizacije na gostoto arbuskulov je bil majhen in se je od K in K+MI malo razlikoval. Vrednosti A% v kontroli z in brez dodanega MI so bile v obeh poskusih skoraj enake, kar nakazuje na veliko naravno prisotnost AM gliv v zemlji, ki je sestavljala substrat.

V LP III sta bili A% in a% največji v obravnavanju Es (Priloga R), vendar se A% statistično ni razlikovala od ostalih obravnavanj, razen od SOL. Vrednost a% se je statistično razlikovala od vseh obravnavanj, razen od kontrole.



Slika 7: Gostota arbuskulov (A%) v LP I (a) in LP II (b) in gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%) v LP I (c) in LP II (d)  
 Stolpec prikazuje povprečje ± SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga O in P)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 7: The density of arbuscules (A%) in the LP I (a) and LP II (b) and density of arbuscules in colonized part of the roots (a%) in the LP I (c) and LP II (d)  
 Column shows the mean ± SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex O and P)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control)

#### 5.1.4.4 Delež rastlin z vezikli

Delež rastlin z vezikli (Preglednica 16) v koreninah jagod smo beležili sočasno z meritvami mikoriznosti. V lončnih poskusih je bil delež rastlin z vezikli v posameznih obravnavanjih velik, vendar je bilo število veziklov v posameznih vzorcih izredno majhno. V LP I so bili vezikli prisotni v skoraj vseh obravnavanjih, vendar v večjem deležu v obravnavanjih brez MI. Velik delež rastlin z vezikli je bil v obravnavanju Bj, Es in Sa. V LP II so bili vezikli prisotni predvsem v obravnavanjih z MI. V obravnavanjih brez MI so bili vezikli prisotni v zelo majhnem deležu le v K in obravnavanju Bj. V LP II je bil največji delež veziklov v obravnavanju Es+MI. V LP III nismo zasledili veziklov. Poleg veziklov smo v vzorcih Bj v LP I in LP II zasledili tudi posamezne spore (Priloga F-7).



Preglednica 16: Delež rastlin z vezikli v lončnih poskusih, 7 tednov po sajenju (%)

Table 16: The part of plants with the vesicles in the pot experiments, 7 weeks after planting (%)

Obravnavanje		LP I	LP II	LP III
Brez MI	Bj	80	10	0
	Sa	50	0	0
	Es	60	0	0
	SOL	44	0	0
	D	0	0	0
	K	40	10	0
Z MI	Bj	40	30	n.p.
	Sa	10	10	n.p.
	Es	20	40	n.p.
	SOL	n.p.	0	n.p.
	D	0	20	n.p.
	K	5	10	n.p.

n.p. - ni podatka

#### 5.1.4.5 Kolonizacija rastlin z DSE in nepoznanimi koreninskimi endofiti

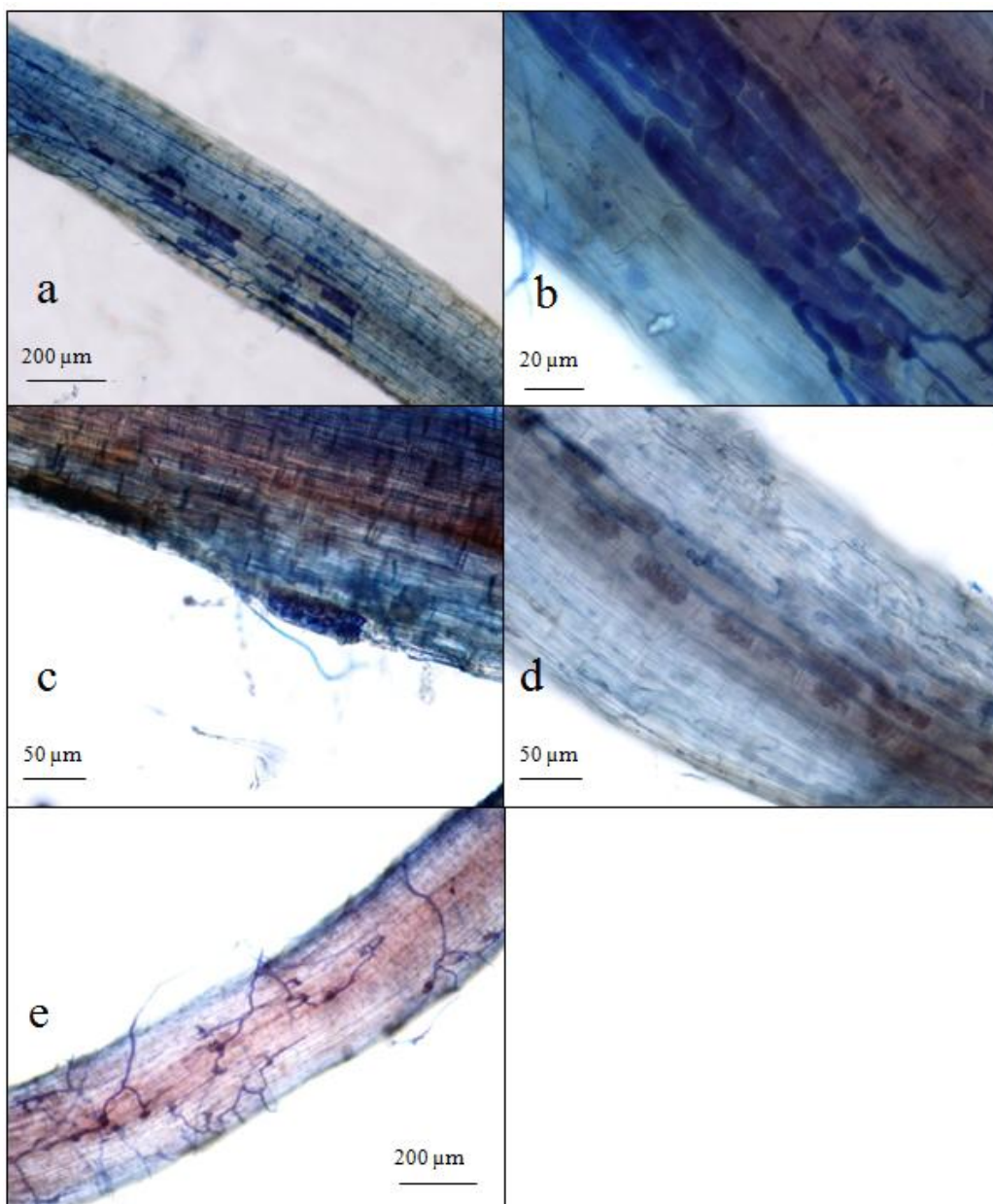
Delež rastlin s strukturami temnih septiranih endofitov oz. mikrosklerocijev nepoznanih koreninskih endofitov v lončnih poskusih je bil v neinokuliranih obravnavanjih majhen, v obravnavanjih z mikoriznim inokulumom pa večji.

Mikrosklerocije smo poimenovali Tip 1 (plošče), Tip 2 (verižice), Tip 3 (grozdi), Tip 4 (pike), Tip 5 (sploščene ali odebeljene hife) in Tip 6 (mehurji).

Tip 1 (Slika 8a, Priloga G-1) smo poimenovali mikrosklerocije, ki so se pod mikroskopom izrazili kot različno veliki, izrazito dolgi in ozki pravokotniki, s stranicami od približno 50 do 100  $\mu\text{m}$  x 10 do 30  $\mu\text{m}$ . Notranjost plošč je bila napolnjena s temnimi okroglastimi strukturami. Plošče so bile med seboj povezane z debelejšimi, septiranimi hifami.

V koreninah sta bila opaženi dve vrsti verižicam podobnih sklerocijev Tipa 2 (Slika 8b, Priloga G-2, G-3). Eden izmed tipov je bil podoben ploščam (Tip 1), drugi pa grozdu (Tip 3). Verižice so se od plošč in grozdov razlikovale po tem, da so bile okroglaste 'celice' med seboj zaporedno nanizane v verižice. Pri prvem tipu so bile 'celice' modro obarvane, v drugem pa rjavo. Strukture so bile dolge približno 200  $\mu\text{m}$ .

Tip 3 (Slika 8c) smo poimenovali mikrosklerocije, ki so bili manj pravilnih oblik, podobni grozdom. Za razliko od plošč so bili debelejši, večplastni, veliki približno 50  $\mu\text{m}$ . Napolnjeni so bili s 'celicami' z izrazito temnim robom, ki so bile podobne drobnim sporam. Celice so bile pod mikroskopom rjavo obarvane. Podobne strukture so bile kot DSE opisane v Botany Blog (<http://botany.thismia.com/2010/02/28/dark-septate-endophytes/>). Podobnost je bila zelo velika tudi z mikrosklerociji, predstavljenimi v članku avtorjev Likar in Regvar (2009).



Slika 8: Tipi DSE oz. nepoznanih koreninskih endofitov

a) Tip 1 (povečava 100 x); b) Tip 2 (povečava 1000 x); c) Tip 3 (povečava 400 x); d) arbuskuli in mikrosklerociji nemikoriznih gliv – Tip 4 (povečava 400 x); e) zelo temne in sploščne hife (Tip 5) (povečava 100 x)

Figure 8: Types of DSE or unknown root endophytes

a) Type 1 (100 x); b) Type 2 (1000 x); c) Type 3 (400 x); d) arbuscules and microsclerotia of fungal structures – Type 4 (400 x); e) very dark and flatness hyphae (Type 5) (100 x)

Tip 4 (Slika 8d) so bili izrazito drobni, pikam podobni mikrosklerociji, velikosti nekaj  $\mu\text{m}$ , ki so bili med seboj povezani z drobnimi hifami. Združeni so bili v manjših skupinah.

Tip 5 so predstavljale sploščene in odebeljene hife (Slika 8e, Priloga G-4). Od mikoriznih hif so se razlikovale po močni obarvanosti z barvilom tripan modro, po sploščenosti in neenakomernih odebelitvah hif. Podobne hife so bile kot DSE opisane v Botany Blog (<http://botany.thismia.com/2010/02/28/dark-septate-endophytes/>). V posameznih vzorcih smo opazili tudi septirane hife (Priloga G-3).

Tip 6 so predstavljali zračnim mehurjem podobni mikrosklerociji, ki so prekrivali praktično celo koreninsko celico. Tip 6 smo opazili le pri rastlinah, ki smo jih odbrali za molekulske analize, 10 mesecev po sajenju.

V LP I in LP II je bilo več rastlin z DSE oz. koreninskimi endofiti v obravnavanjih, katerim je bil dodan MI (Preglednica 17). Največ rastlin z DSE je bilo v LP I in LP II v obravnavanjih Es+MI. Od vseh mikrosklerocijev je v LP I in LP III prevladoval Tip 4 v LP II pa Tip 1 in Tip 3. V LP III so bile v obravnavanju Bj prisotne sploščene in odebeljene hife. V vseh treh poskusih v obravnavanjih Sa in K, brez dodanega MI, mikrosklerociji niso bili prisotni.

V LP III so bili DSE ali nepoznani koreninski endofiti v skoraj vseh obravnavanjih, razen Sa in K. Delež rastlin z mikrosklerociji je bil majhen.

Preglednica 17: Delež rastlin z DSE oz. nepoznanimi koreninskimi endofiti v lončnih poskusih, 7 tednov po sajenju (%)

Table 17: The part of plants with DSE or unknown root endophytes in pot experiments, 7 weeks after planting (%)

Obravnavanje		LP I	LP II	LP III
Brez MI	Bj	60(Tip 4, Tip 2)	0	30 (Tip 5)
	Sa	0	0	0
	Es	0	10 (Tip 4)	10 (Tip 4)
	SOL	20 (Tip 4)	0	10 (Tip 4)
	D	0	0	10 (Tip 1)
	K	0	0	0
Z MI	Bj	20 (Tip 2)	40 (Tip 1)	n.p.
	Sa	20 (Tip 4)	20 (Tip 3)	n.p.
	Es	50 (Tip 4, Tip 1)	40 (Tip 1)	n.p.
	SOL	n.p.	0	n.p.
	D	40 (Tip 4)	20 (Tip 3)	n.p.
	K	10 (Tip 4)	0	n.p.

n.p. - ni podatka

### 5.1.5 Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za glomeromicete

Molekulska identifikacija mikoriznih gliv smo izvedli na rastlinah iz drugega lončnega poskusa. Odbrali smo rastline iz tistih obravnavanj, ki so imele ob prvem pregledu mikorizne kolonizacije (7 tednov po sajenju) večji delež arbuskulov (K, K+MI; Slika 7) ali mikrosklerocijev DSE in nepoznanih koreninskih endofitov (Es, Es+MI, Sa+MI)

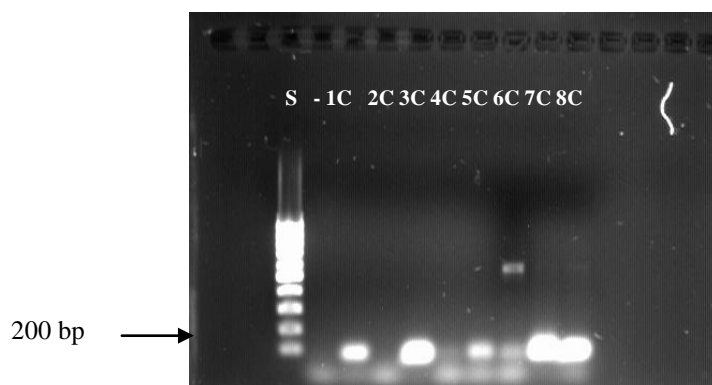
(Preglednica 17) in so na osnovi določitve mikorizne kolonizacije pod svetlobnim mikroskopom najbolj izrazito predstavljali arbuskularno mikorizo in DSE. Iz odbranih rastlin smo 10 mesecev po sajenju ponovno odvzeli vzorce korenin. Potek priprave vzorcev in ocenjevanje parametrov mikoriznosti in DSE so podani v poglavju 4.1.8.3. Ugotovili smo, da se je stopnja mikorizne in nemikorizne kolonizacije v nekaj mesecih spremenila (Priloga S). Parametri mikoriznosti F%, M% in m% so bili po 10 mesecih v povprečju večji v primerjavi z meritvami neposredno po sajenju, gostota arbuskulov (A% in a%) pa nižja.

Zastopanost nemikoriznih struktur se je, v primerjavi z osnovnimi podatki, pri nekaterih rastlinah bolj, pri drugih pa manj, spremenila. Na koreninah je bilo ob drugem odvzemu prisotnih več mikrosklerocijev različnih tipov. Na rastlini Es+MI 1 so bili na četrtini delov korenin prisotni mikrosklerociji Tipa 1. Na Sa+MI 6 so bili ob prvem odvzemu prisotni mikrosklerociji Tipa 3, ob drugem pa na eni petini delov korenin Tip 2. Na Es 10 je bil na eni tretjini delov korenin prisoten Tip 4, na dveh tretjinah pa Tip 3. Na Es 6 so bili ob prvem odvzemu prisotni mikrosklerociji Tipa 4, ob drugem pa Tip 6, za katere smo najprej predvidevali, da so nastali zaradi napak pri obarvanju vzorca.

Iz odvzetih vzorcev korenin smo izolirali DNA (4.1.9.2) in jo pomnožili z različnimi začetnimi oligonukleotidi (4.1.9.3).

#### 5.1.5.1 PCR z začetnima oligonukleotidoma AM1 in NS31

V PCR, kjer smo direkten produkt DNA vseh odbranih vzorcev pomnožili z začetnima oligonukleotidoma AM1 in NS31, smo zadostno količino produkta, približne velikosti 200 bp, dobili pri vzorcih 1C, 3C, 5C, 7C in 8C (Slika 9).



Slika 9: Produkti PCR (AM1 in NS31) (dodan direkten produkt DNA)  
Vzorci 1C,2C,3C,4C,5C,6C,7C in 8C; S - standard (lestvica 100 bp); – negativna kontrola

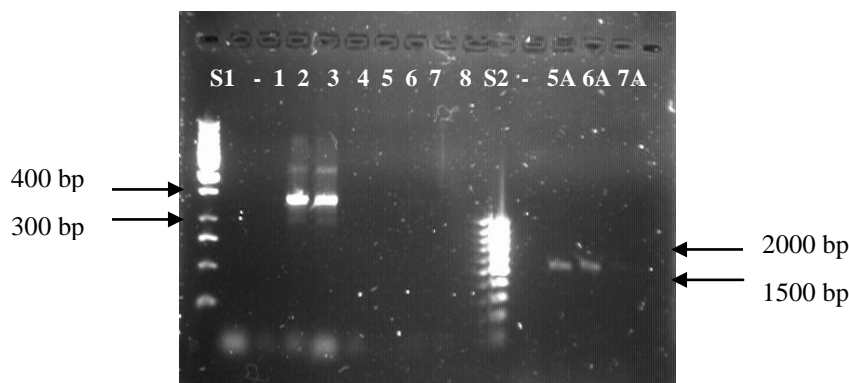
Figure 9: PCR products (AM1 and NS31) (direct product of DNA)  
Samples 1C, 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 7C and 8C S - standard (scale of 100 bp); - the negative control

V PCR z AM1 in NS31 so bili vključeni tudi direktni vzorci DNA iz koreninskega sistema rastlin z veliko gostoto arbuskulov (vzorci 5, 6 in 7). V desnem delu elektroferograma (Slika 10) je vidna majhna količina PCR produkta vzorcev 5A in 6A, velikosti med 1500 in 2000 bp.

### 5.1.5.2 PCR z začetnima oligonukleotidoma MH2 in MH4

V PCR z začetnima oligonukleotidoma MH2 in MH4 je bilo vključenih 8 (od 1 do 8) direktnih produktov DNA iz LP II (Preglednica 2).

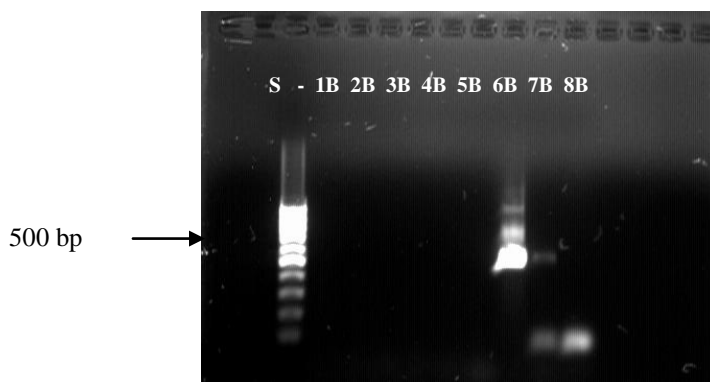
Iz elektroferograma (Slika 10) je razvidno, da smo od vseh vzorcev, katerih DNA smo pomnoževali z navedenima začetnima oligonukleotidoma, zadostno količino produkta DNA dobili pri vzorcih 2 in 3. Dobljena produkta sta bila med 300 in 400 bp.



Slika 10: Produkti PCR (MH2 in MH4 ter AM1 in NS31)  
Vzorci 1,2,3,4,5,6,7 in 8 (MH2 in MH4) ter 5A, 6A in 7A (AM1 in NS31); S1 - standard (lestvica 100 bp); S2 - standard (lestvica 1kb); – negativna kontrola

Figure 10: PCR products (MH2 and MH4; AM1 and NS31)  
Samples 1,2,3,4,5,6,7 and 8 (MH2 and MH4) and 5A, 6A and 7A (AM1 and NS31) S1 - standard (scale of 100 bp); S2 - standard (1KB scale); - negative control

Vzorci smo nadalje pomnožili z vgnezdno PCR. Za pomnoževanje DNA smo uporabili začetna oligonukleotida AM1 in NS31. Zadostno količino produkta smo dobili pri vzorcu 6B (Slika 11). Produkta z majhno koncentracijo DNA smo dobili pri vzorcih 7B in 8B. Vzorec 6B je imel velikost med 500 in 600 bp.



Slika 11: Produkti vgnezdene PCR (AM1 in NS31)  
Vzorci 1B,2B,3B,4B,5B,6B,7B in 8B; S - standard (lestvica 100 bp); – negativna kontrola

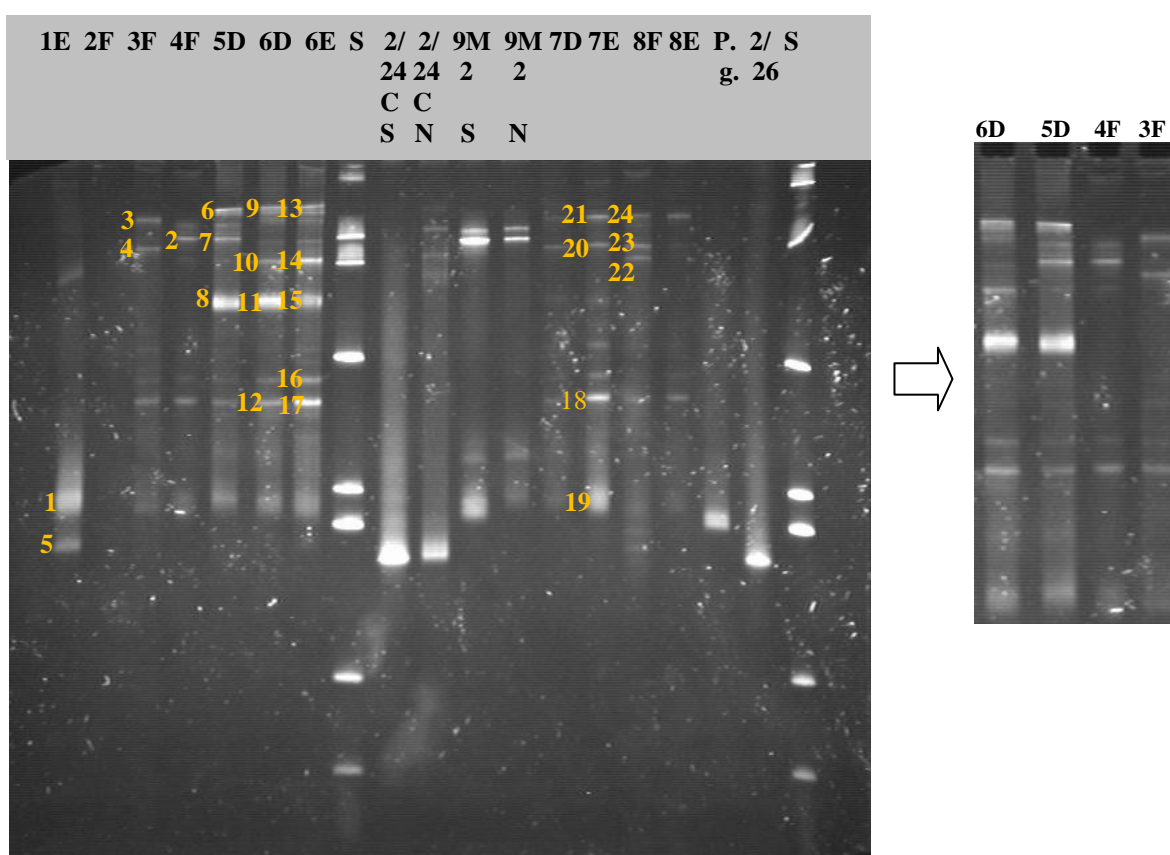
Figure 11: Products of nested PCR (AM1 and NS31)  
Samples 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B, 7B and 8B, S - standard (scale of 100 bp) - negative control

### 5.1.5.3 Pomnoževanje za TTGE

Za TTGE smo produkte DNA iz prvega PCR (vzorci 5A, 6A in 7A), drugega PCR (vzorci od 1 do 8B) in tretjega PCR (vzorci 1, 2, 3, 4 in 8C) (Slika 1) pomnožili z začetnima oligonukleotidoma NS31-GC in Glo1. Začetni oligonukleotid NS31-GC s 30 bp dolgo GC spono stabilizira talilne lastnosti fragmentov DNA v procesu analize TTGE. Za primerjavo smo vključili tudi vzorce *Cylindrobasidium* sp., *Phialophora gregata* in *Glomus* sp.

Zadostno količino produktov smo dobili pri vzorcih 6E, 4F, 8F, 5D, 6D, 7D, 2/24S, P.g. in 9M/2.

### 5.1.5.4 Analiza TTGE



Slika 12: TTGE profili in izsek elektroferograma vzorcev 6D, 5D, 4F in 3F

Vzorci: 1E, 2F, 3F, 4F, 5D, 6D, 6E, 7D, 7E, 8E, 8F, 2/24 C S *Cylindrobasidium laeve* S – stara pomnožitev; 2/24 C N *Cylindrobasidium laeve* N – nova pomnožitev; 9M/2 S – *Glomus* sp. S – stara pomnožitev; 9M/2 N – *Glomus* sp. N – nova pomnožitev; 2/26 – *Pharotheca fissurella*; P.g. – *Phialophora gregata*; S – standard (lestvica 100 bp)

Figure 12: TTGE profiles and a part of electropherograms of samples 6D, 5D, 4F and 3F

Samples: 1E, 2F, 3F, 4F, 5D, 6D, 6E, 7D, 7E, 8E, 8F, 2/24 CS *Cylindrobasidium laeve* S - old multiplication, 2/24 CN *Cylindrobasidium laeve* N - new multiplication; 9M / 2 S - *Glomus* sp. S - old multiplication; 9M / 2 N - *Glomus* sp. N - new multiplication; 2/26 - *Pharotheca fissurella*, Pg - *Phialophora gregata*, S - standard (scale 100 bp)

Produkte PCR smo razčlenili na posamezne komponente z molekularno tehniko TTGE. Iz poliakrilamidnega gela smo izrezali izbrane fragmente. Iz njih smo ekstrahirali DNA in jo ponovno pomnožili z začetnima oligonukleotidoma NS31 in Glo1. Za čiščenje smo uporabili Wizard® SV Gel in PCR Clea-Up System.

TTGE profile naših vzorcev DNA smo primerjali z že znanimi glivami *Cylindrobasidium laeve*, *Glomus* sp., *Pharotheca fissurella* in *Phialophora gregata*, z identificiranim nukleotidnim zaporedjem. Ugotovili smo, da se je TTGE profil našega vzorca številka 5 ujema s profilom glive *Cylindrobasidium laeve*, profil 1 pa s profilom *Glomus* sp. Ostali vzorci se niso ujeli s profili že identificiranih gliv.

Iz TTGE smo izrezali 24 vzorcev (bendov), vendar jih je bilo za nadaljnje delo primernih 12 (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 17) (Preglednica 18).

Preglednica 18: Oznaka vzorca in številka fragmenta izrezanega iz poliakrilamidnega gela ter oznaka klonov za sekvenciranje

Table 18: Source and code of sample, code of sample on the polyacrylamide gel, and the number of the fragment cut from the polyacrylamide gel

Izvor vzorca	Oznaka nanešenega vzorca	Številka fragmenta TTGE	Oznaka klona za sekvenciranje
<i>Eruca sativa</i>	1E	1, 5	1b, 5a
<i>Sinapis alba</i>			2Aa
<i>Eruca sativa</i>	3F	3, 4	3a, 4a
<i>Eruca sativa</i>	4F	2	2a
Kontrola	5D	6, 7, 8	7c
Kontrola	6E	9, 10, 11, 12	9d, 10c, 11d, 12c
Kontrola	6D	13, 14, 15, 16, 17	15d, 17b
Kontrola	7E	18, 19, 20, 21	
Kontrola	8F	22, 23, 24	

Po ligaciji in transformaciji smo za sekvenciranje pripravili 12 vzorcev (Preglednica 19). Vzorce smo obdelali za potrebe sekvenciranja. Nukleotidna zaporedja smo identificirali s pomočjo programskega paketa BLAST (Altschul in sod., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) in baze podatkov Gen Bank (NCBI).

Preglednica 19: Identifikacija sekvenc iz TTGE

Tabel 19: Identification of sequences from TTGE

Fragment iz TTGE	Št akcesije v GenBank	Najbližji GenBank match	% (E vrednost podobnosti)
1	DQ520098	<i>Ceratobasidium</i> sp.*	99% (4e-115)
	D85646	<i>Rhizoctonia</i> sp.	98% (9e-112)
2	EU573762	Uncultured <i>Glomus</i>	99% (4e-115)
3	EU573765	Uncultured <i>Glomus</i>	98% (9e-112)
4	AJ852534	<i>Glomus</i> sp.	99% (4e-115)
7	AM946834	Uncultured <i>Glomus</i>	98% (9e-112)
9	EU332711	<i>Glomus</i> sp.	99% (9e-117)
	Y17640	<i>Glomus fasciculatum</i>	99% (5e-114)
10	AM946834	Uncultured <i>Glomus</i>	98% (2e-113)
11	AM946834	Uncultured <i>Glomus</i>	98% (2e-113)
12	EU123454	Uncultured <i>Glomus</i>	99% (4e-115)
15	EU123454	Uncultured <i>Glomus</i>	99% (9e-117)
17	EU123460	Uncultured <i>Glomus</i>	97% (4e-110)

\* *Ceratobasidium* sp.= telemorf glive *Rhizoctonia* sp.

V preglednici 19 so predstavljeni taksoni gliv, katerih sekvence so imele največji odstotek ujemanja s pridobljenimi sekvencami. Ugotovili smo, da so vzorci 3F, 4F, 5D, 6D in 6E vsebovali genetsko sorodne vrste *Glomus* (Uncultured *Glomus*), vzorca 3F in 6D *Glomus* sp. ter 6D *Glomus fasciculatum*. V vzorcu 1E smo določili *Ceratobasidium/Rhizoctonia* kompleks, ki je lahko potencialno DSE skupina gliv (Yuan in sod., 2010).

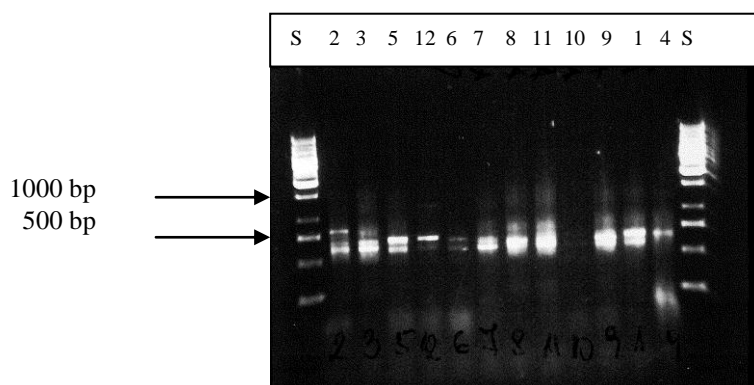
## 5.1.6 Molekulska identifikacija gliv z začetnimi oligonukleotidi za regijo ITS

### 5.1.6.1 PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 1 f in ITS 4

V PCR I z ITS 1f in ITS 4 je bilo vključenih 12 vzorcev, od katerih je bilo 8 direktnih produktov DNA iz LP III in 4 direktni produkti DNA iz LP II (Preglednica 8, Priloga T). V vzorcih 4 in 7 ni bilo mikrosklerocijev; v vzorcu 1, 2 in 8 zelo malo; v vzorcu 10 le Tip 2; v vzorcu 11 Tip 6; v vzorcu 6 Tip 4 v velikem deležu; v vzorcih 5 in 9 Tip 1 in Tip 2; v vzorcih 3 in 12 pa so bili v večjem deležu prisotni mikrosklerociji skoraj vseh oblik.

Produkte z zadostno koncentracijo DNA smo dobili pri skoraj vseh vzorcih, razen pri vzorcu 10 (Slika 13). Velikost vzorcev se je gibala med 600 in 1000 bp.





Slika 13: Produkti PCR (ITS 1f in ITS 4)  
 Direkten produkt DNA vzorcev od 1 do 12; S - standard (lestvica 1kb)

Figure 13: PCR products (ITS 1F and ITS 4)  
 DNA direct product of samples from 1 to 12, S - standard (scale 1KB)

### 5.1.6.2 PCR z začetnima oligonukleotidoma ITS 4 in ITS 3 GC

V PCR je bilo vključenih vseh 12 vzorcev (od 1A do 12A). Produkta velikosti med 300 in 400 bp smo dobili v vseh vzorcih.

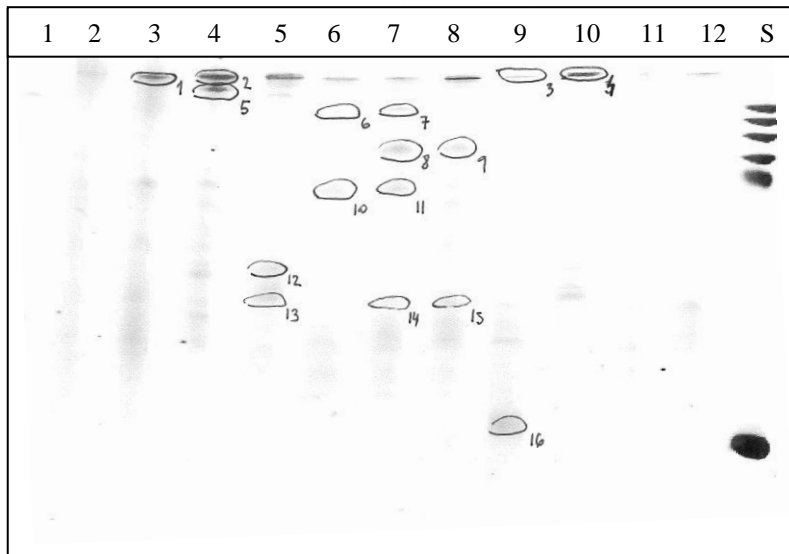
### 5.1.6.3 Analiza TTGE

Produkta PCR od 1B do 12 B smo nanesli na poliakrilamidni gel. Na izrazito slabo obarvanem elektroferogramu (Slika 14) smo odbrali 16 fragmentov (bandov), ki smo jih izrezali, ekstrahirali DNA in jo ponovno namnožili (Priloga U). Odbrali smo 8 fragmentov (Preglednica 20), ki smo jih po ligaciji in transformaciji pripravili za sekvenciranje. Uspele so štiri določitve (Preglednica 21). Od teh so bile *Glomus intraradices*, *Microdiplodia* sp. in dve nepoznani glivi.

Preglednica 20: Izvor vzorca in številka fragmenta, izrezanega iz poliakrilamidnega gela

Table 20: Source of sample and the number of the fragment cut from the polyacrylamide gel

Izvor vzorca	Številka fragmenta TTGE
<i>Brasica juncea</i>	/
<i>Eruca sativa</i>	/
<i>Brasica juncea</i>	1
<i>Sinapis alba</i>	2,5
Segrevanje tal	12,13
Kontrola	6,10
<i>Eruca sativa</i>	7,8,11,14
<i>Sinapis alba</i>	9,15
<i>Eruca sativa</i> + MI	3,16
<i>Sinapis alba</i> +MI	4
<i>Eruca sativa</i>	/
<i>Eruca sativa</i>	/



Slika 14: TTGE profili  
 Vzorci od 1 do 16; S - standard (lestvica 100 bp)

Figure 14: TTGE profiles  
 Samples of 1 to 16, S - standard (scale 100 bp)

Preglednica 21: Identifikacija sekvenc DSE in nepoznanih koreninskih endofitov

Table 21: Identification of sequences of DSE and unknown root endophytes

Fragment iz TTGE	Št akcesije v GenBank	Najbližji GenBank match	% (E vrednost podobnosti)
1	AJ567763	<i>Glomus intraradices</i>	98% (0,0)
5	-	-	-
6	EU003028	Uncultured fungus	98% (8e-178)
8	-	-	-
10	EU003028	Uncultured fungus	99% (0,0)
12	-	-	-
14	-	-	-
16	EF432267	<i>Microdiplodia</i> sp.	98% (5e-172)

## **5.2 Poljski poskus**

### **5.2.1 Vpliv alternativnih metod razkuževanja na parametre rasti in rodnosti jagod**

#### **5.2.1.1 Intenzivnost rasti jagod**

Intenzivnost rasti jagod se je v naših poskusih najbolj izražala v številu in velikosti listov, številu poganjkov na rastlino, premeru koreninskega vratu ter bujnosti izraščanja živic. V poljskem poskusu, ki je vključeval zelo veliko število rastlin, smo intenzivnost rasti ovrednotili s številom listov in živic v jeseni po sajenju (september, oktober 2002).

Povprečno število listov na rastlino, tri mesece po sajenju, je bilo največje v obravnavanju, kjer smo tla kemično razkuževali z dazometom (Priloga K). Po intenzivnosti rasti se rastline statistično niso razlikovale od rastlin, ki so bile posajene v obravnavanjih, v katerih sta bili zaorani biocidni rastlini Sa in Es. V ostalih obravnavanjih, vključno s kontrolo, je bila rast rastlin manjša ali izenačena. Najnižjo oceno rasti 1,7 (najvišja ocena - 3) so dosegle rastline v obravnavanjih SOL PF 9 in SOL ČF 6. Najboljšo rast (ocena - 2,7) so imele jagode v obravnavanjih z biocidnima rastlinama Bj in Es. V poskusu ni propadla nobena rastlina.

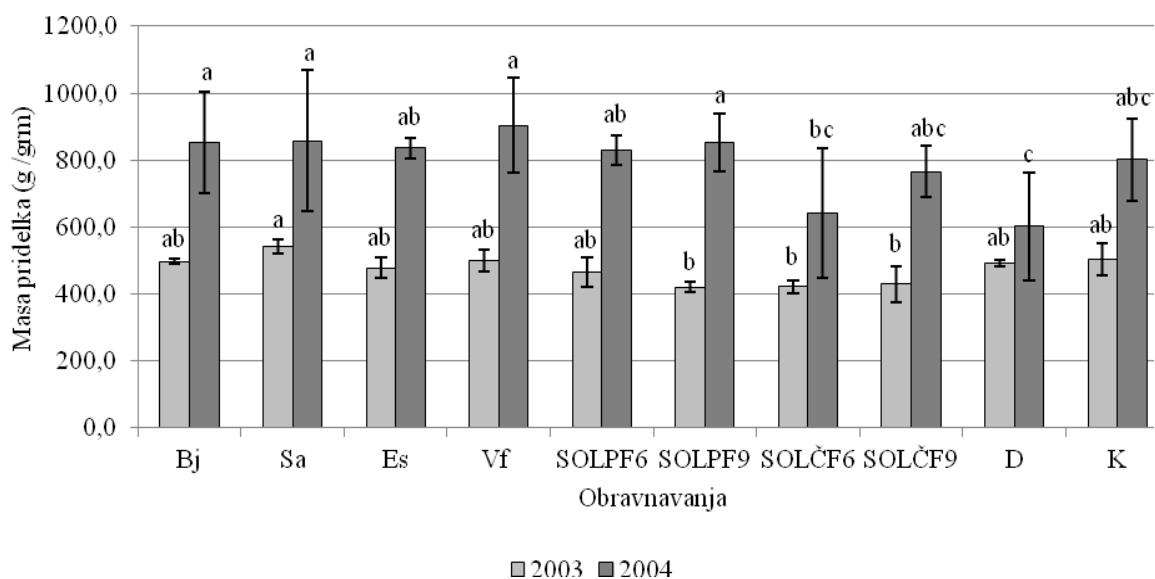
Rast živic je bila med obravnavanji dokaj izenačena (Priloga K). Prav tako kot pri izraščanju listov, je bila rast živic najbolj bujna v obravnavanjih D, Sa in Es, najmanjša pa v obravnavanju SOL ČF 9.

#### **5.2.1.2 Rodnost jagod**

Parametre rodnosti so poleg mase pridelka na rastlino predstavljali tudi intenziteta cvetenja, število plodov in povprečna masa plodu v celotnem obiranju. Cvetenje je bilo v vseh obravnavanjih zelo izenačeno (Priloga L). Razlike niso bile statistično značilne. V povprečju je bilo največ cvetov na rastlino v obravnavanju D, najmanj pa v K. Maso pridelka na grm smo spremljali dve rodni leti (Slika 15). V količini pridelka je v prvem letu statistično odstopalo le obravnavanje z biocidno rastlino Sa v primerjavi s SOL ČF 6 in 9 ter SOL PF 9. Drugi največji pridelek je bil dosežen v kontroli, vendar se od ostalih obravnavanj ni statistično razlikoval.

Podobni so bili rezultati tudi pri številu plodov, kjer sta se statistično med seboj razlikovali le obravnavanji Sa in SOL ČF 6. Vsa ostala obravnavanja so bila med seboj izenačena. Razlike v povprečni masi plodu so bile med obravnavanji statistično značilne, vendar dejansko izredno majhne in nepomembne (Priloga L).

V drugem letu so bile razlike v povprečnem pridelku med obravnavanji majhne. Razlika je bila opazna le v razmerju med obravnavanjem Vf, kjer so rastline dosegle največji pridelek in so se statistično značilno razlikovale od najmanjšega pridelka v obravnavanju D in SOL ČF 6. Skupna količina pridelka v drugem letu je bila večja od pridelka v prvem letu za 67 %.



Slika 15: Povprečna masa pridelka na gram v prvem in drugem letu poljskega poskusa  
 Stolpec prikazuje povprečje  $\pm$  SN.Vrednosti, označene z različnimi črkami pri enotno obarvanih stolpcih, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga L in M)  
 (Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

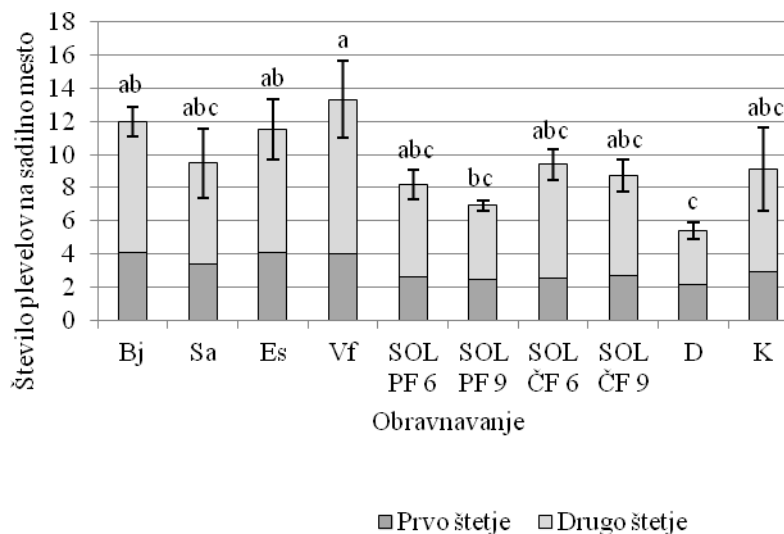
Figure 15: Average yield per bush in the first and second year in the field experiment  
 Column shows the average  $\pm$  SE. Values marked with different letters in a united-colored columns are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex L and M)  
 (Bj = *Brassica juncea*, Sa = *Sinapis alba*, Es = *Eruca sativa*, Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = Solarization - transparent foil - 6 weeks; SOL PF 9 = Solarization - transparent foil - 9 weeks; SOL ČF 6 = Solarization - black foil - 6 weeks; SOL ČF 9 = Solarization - black foil - 9 weeks, D = dazomet, K = control)

### 5.2.2 Vpliv alternativnih metod razkuževanja tal na prisotnost plevelnih rastlin

Število plevelov, ki smo jih prvič šteli 18 dni po sajenju in drugič 53 dni po sajenju jagod, je med obravnavanji zelo nihalo, vendar se podatki med seboj statistično niso razlikovali. V obravnavanjih, kjer so bile posejane rastline za podor, je bilo število plevelov večje kot v obravnavanjih SOL, D in K. Po velikem številu plevelov je izstopalo obravnavanje Vf, ki se je edino statistično razlikovalo od kemičnega razkuževanja z dazometom, kjer je bilo najmanj plevelnih rastlin. Obravnavanja Bj, Sa, Es in bob se od kontrole, kjer so zaorano organsko snov predstavljale le posamezne plevelne rastline, ki so se razrasle med okopavanji, niso statistično značilno razlikovala.

Iz slike 16 je razvidno, da se je obravnavanju D, po delovanju na plevelne rastline, najbolj približalo delovanje SOL PF 9. Visoke temperature pod prozorno folijo so verjetno uničile seme plevelnih rastlin. Iz slike je tudi razvidno, da je bilo število plevelov ob prvem štetju, po 18 dneh, v vseh obravnavanjih zelo izenačeno. Ob drugem štetju, ki smo ga izvedli 53 dni po sajenju, so postale razlike bolj očitne. Domnevamo, da je imela na rast plevelov veliko vpliva dodana organska snov, ki se je začela po določenem času mineralizirati.

Vplivala je tudi na zračnost substrata in s tem na boljše kalilne in rastne pogoje za jagode in plevelne rastline.



Slika 16: Število plevelov na sadilno mesto v poljskem poskusu

Stolpec prikazuje povprečje  $\pm$  SN.Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri enotno obarvanih stolpcih, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga N)

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 16: Number of weeds in planting place in the field experiment

Column shows the mean  $\pm$  SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0.05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex N)

(Bj = *Brassica juncea*, Sa = *Sinapis alba*, Es = *Eruca sativa*, Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = Solarization - transparent foil - 6 weeks; SOL PF 9 = Solarization - transparent foil - 9 weeks; SOL ČF 6 = Solarization - black foil - 6 weeks; SOL ČF 9 = Solarization - black foil - 9 weeks, D = dazomet, K = control)

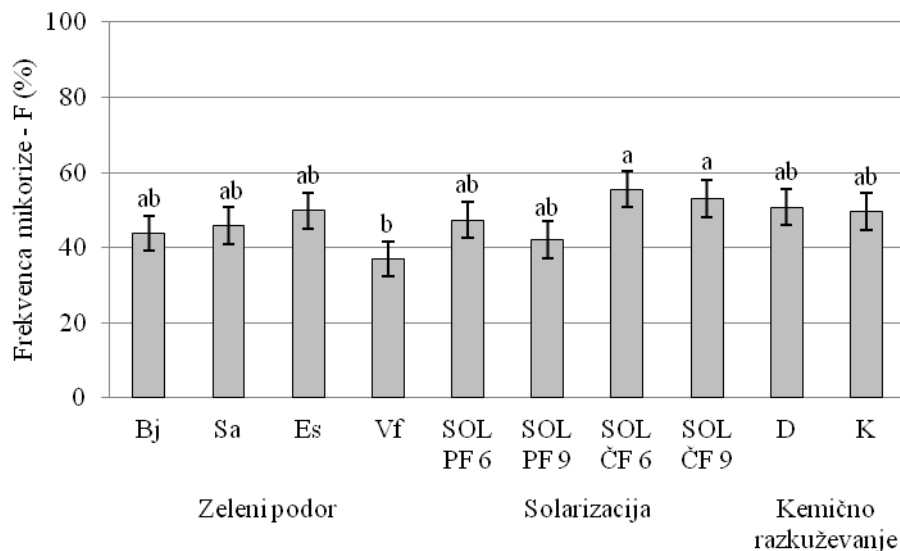
### 5.2.3 Mikorizna in nemikorizna kolonizacija korenin jagod

V poljskem poskusu so bile razlike v mikoriznosti med obravnavanji neizrazite (Slika 17, Priloga V), statistično neznačilne. F% je bila največja v obravnavanjih s črno folijo (SOL ČF 6 in SOL ČF 9) vendar se je statistično značilno razlikovala le od obravnavanja, v katerem je bil zaoran drobnoplodni krmni bob (Vf).

M% se med obravnavanji ni statistično razlikovala (Priloga V). V povprečju je bila, v primerjavi z ostalimi obravnavanji, največja v obravnavanjih s prozorno folijo in najmanjša v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami. Vrednosti m% so se med obravnavanji razlikovale podobno kot vrednosti M%.

A% se med obravnavanji ni statistično razlikovala. Vrednosti so bile izredno majhne, od 0,3 do 1,3 %. Nekoliko večja je bila le A% v kontroli (1,1 %) in v obravnavanju s Sa (1,3 %).

Razlike v gostoti arbuskulov v koloniziranih delih korenin so bile v primerjavi z A% nekoliko večje, vendar sta se med seboj statistično razlikovali le gostoti v obravnavanju SOL ČF 9 in Sa. Med vsemi ostalimi obravnavanji ni bilo statistično značilnih razlik.



Slika 17: Frekvenca mikorize (F%) v poljskem poskusu

Stolpec prikazuje povprečje ( $n = 5$ )  $\pm$  SN. Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) (Priloga H)

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija – 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija – 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija – 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija – 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 17: Frequency of mycorrhiza (F%) in the field experiment

Column shows the mean ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Values marked with different letters are statistically different at  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncan's test) (Annex H)

(Bj = *Brassica juncea*, Sa = *Sinapis alba*, Es = *Eruca sativa*, Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = Solarization - transparent foil - 6 weeks; SOL PF 9 = Solarization - transparent foil - 9 weeks; SOL ČF 6 = Solarization - black foil - 6 weeks; SOL ČF 9 = Solarization - black foil - 9 weeks, D = dazomet, K = control)

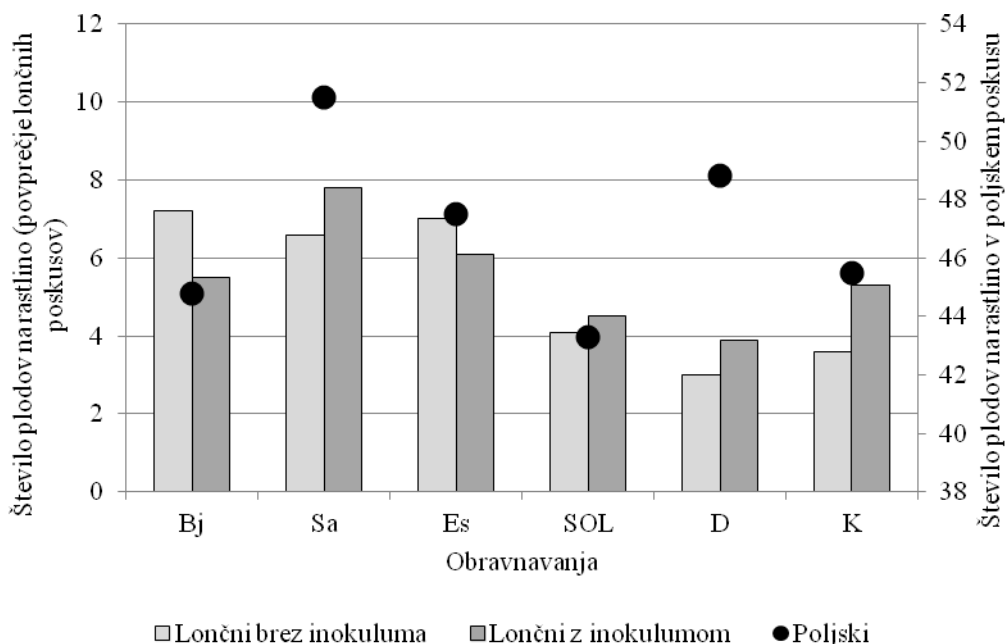
Vezikle smo v rastlinah spremljali sočasno z mikorizno kolonizacijo. Razlike med obravnavanji niso bile statistično značilne. V povprečju, ne glede na obravnavanja, so bili vezikli prisotni pri 43,5 % rastlin (Priloga Z). Največ rastlin z vezikli je bilo v obravnavanjih pod prozorno folijo, najmanj pa v obravnavanjih Vf in Sa. Majhno število rastlin z vezikli je bilo v obeh obravnavanjih s črno folijo, kar je nasprotno v primerjavi s frekvenco mikorize. Predvidevamo, da je prišlo do napake v razlikovanju med vezikli in veziklom podobnimi mikrosklerocij. Pri lončnih poskusih smo upoštevali razlike med vezikli mikoriznih gliv in mikrosklerociji nemikoriznih gliv.

Prisotnost nemikoriznih mikrosklerocijev na koreninah se je med obravnavanji razlikovala (Priloga Z). Razlike med obravnavanji niso bile statistično značilne. Največ rastlin z nemikoriznimi mikrosklerociji je bilo v obravnavanju SOL PF 6, D in SOL ČF 9, najmanj pa v obravnavanjih Sa in Vf (3,3 %) ter v kontroli (4,8 %). Biocidne rastline niso izrazito vplivale na delež rastlin z nemikoriznimi mikrosklerociji.

### 5.3 Primerjava vplivov alternativnih metod razkuževanja na jagode

#### 5.3.1 Primerjava med lončnimi in poljskim poskusom

V lončnih poskusih sta bili masa listov in število plodov, v primerjavi s poljskim poskusom, izrazito manjši. Razlog za razliko je bil v različnih tipih sadik, ki smo jih v poskusih sadili. V poljskem poskusu smo sadili frigo sadike, v lončnih poskusih pa izrazito šibke, tkivno vzgojene sadike. Razlike so bile tudi med posameznimi lončnimi poskusi. Razlog je bil v različnem obdobju sajenja poskusov, različni starosti mikoriznega inokuluma, prepolovljeni količini dazometa v LP III in v izpadu obravnavanja SOL+MI v LP I. Za primerjavo med posameznimi poskusi nismo vzeli absolutnih vrednosti meritev posameznega dejavnika v posameznem LP, ampak povprečje, ki je le nakazalo trend posameznega obravnavanja.



Slika 18: Povprečno število plodov na rastlino v vseh lončnih poskusih v primerjavi s sorodnimi obravnavanji v poljskem poskusu

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija (lončni poskusi) podatek za poljski poskus SOL PF 9; D = dazomet; K = kontrola)

Figure 18: The number of fruits per plant in each pot experiments compared with similar treatments in the field experiment

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = Solarization (pot experiments), SOL PF 9 - data for field trial; D = dazomet; K = control)

Povprečno število plodov v lončnih poskusih smo v obravnavanjih brez MI izračunali na osnovi treh poskusov, obravnavanja z MI pa na osnovi dveh poskusov. Izjema je bilo obravnavnje SOL+MI, ki temelji zgolj na LP II. Podatki niso bili statistično ovrednoteni. V primerjavi povprečnega števila plodov iz vseh lončnih poskusov s številom plodov v poljskem poskusu (Slika 18), je bila bistvena razlika med številom plodov v lončnih in

poljskem poskusu. Povprečno število plodov v lončnih poskusih je nihalo med 3 in 8 plodov na rastlino, v poljskem poskusu pa med 43 in 52.

V lončnih poskusih je bilo povprečno število plodov v obravnavanjih brez dodanega MI v obravnavanjih Bj in Es večje kot v obravnavanjih z MI. V ostalih obravnavanjih je bilo število plodov v obravnavanjih z MI večji kot v obravnavanjih brez MI.

V lončnih in poljskem poskusu je bil največji pridelek (glede na število plodov) dosežen v obravnavanjih Sa. Med obravnavanji kemičnega razkuževanja (D) v lončnih in poljskem poskusu, so bile razlike v številu plodov velike. V poljskem poskusu je bil doseženi pridelek na kemično razkuženih parcelah velik (tako za Sa), v lončnih poskusih pa izrazito majhen ali pa ga ni bilo.

V lončnih poskusih sta obravnavanju Sa sledili obravnavanji Es in Bj ter nato K in SOL.

### **5.3.2 Primerjava vplivov alternativnih metod razkuževanja na merjene parametre**

Alternativne metode razkuževanja so v primerjavi s kontrolo (z in brez MI) v lončnih poskusih značilno vplivale na posamezne parametre (pozitivno - rdeče in oranžno obarvana polja; brez vpliva – rumeno obarvana polja; negativno - svetlo in temno sivo obarvana polja). V poljskem poskusu odstopanj v obravnavanjih, razen v številu listov med D in K ter deležu DSE oz. nepoznanih koreninskih endofitov v obravnavanju SOL PF 6 v primerjavi s kontrolo, ni bilo.

V prvem lončnem poskusu je imela, v primerjavi s kontrolo, največ pozitivnih učinkov biocidna rastlina Sa in sicer v obravnavanjih z in brez mikoriznega inokuluma. Največ pozitivnih vplivov v primerjavi med inokuliranimi obravnavanji in neinokulirano kontrolo je bilo prav tako doseženih pri Sa. V LP II je bil vpliv Sa nekoliko manj izrazit le v primerjavi inokuliranih obravnavanj, kjer je bil bolj izrazit vpliv Bj. V primerjavi s kontrolo je bil izražen negativen vpliv Sa na gostoto arbuskulov v inokuliranih in neinokuliranih rastlinah. V LP III je bil vpliv vseh treh biocidnih rastlin v primerjavi s kontrolo velik.

Vse alternativne metode razkuževanja so imele največji vpliv na zapleveljenost, nato na rast jagod oz. listno maso, število plodov in DSE oz. nepoznane koreninske endofite. Vpliv razkuževanja na mikorizno kolonizacijo jagod je bil neizrazit (rumeno obarvana polja). Negativen vpliv (sivo obarvana polja) je bil le pri kemičnem razkuževanju z dazometom v LP I in LP II, ter v neinokuliranih obravnavanjih drugega lončnega poskusa. Z inokulacijo rastlin z mikoriznim inokulumom ob sajenju se je morebitni negativen vpliv alternativnih metod na mikorizne glive v vseh obravnavanjih izničil. V vseh poskusih sta na delež rastlin z DSE oz. nepoznanih koreninskih endofitov imeli velik vpliv obravnavanji Es in Bj.



Lončni poskus	Obravnavanja		Masa listov g/rastl	St.plo dov./ rastl.	St.ple velov/ rastl.	F%	M%	m%	A%	a%	DSE %	
LP I	Neinokulirana obravnavanja/ Ne inokulirana kontrola	Bj	1,6	1,4	0,8	1,1	1,7	1,5	1,9	1,1	60,0	
		Sa	3,0	1,6	0,4	1,0	2,3	2,0	2,3	1,0	0,0	
		Es	2,6	1,3	0,6	1,1	1,5	1,4	0,7	0,5	0,0	
		SOL	1,0	1,0	0,9	1,1	1,4	1,3	1,0	0,7	20,0	
		D	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Inokulirana obravnavanja/ Inokulirana kontrola	Bj	1,8	1,5	0,4	1,1	0,7	0,7	0,4	0,6	2,0	
		Sa	3,4	2,1	0,2	1,0	1,4	1,3	1,2	0,7	2,0	
		Es	2,0	1,3	0,7	1,0	0,7	0,7	0,4	0,4	5,0	
		SOL	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	
		D	1,9	0,7	0,1	0,9	0,8	0,9	0,6	0,7	4,0	
	Inokulirana obravnavanja/ Neinokulirana kontrola	Bj	1,8	1,6	0,5	1,0	0,9	0,9	0,5	0,6	20,0	
		Sa	3,3	2,3	0,3	1,0	1,9	1,8	1,5	0,7	20,0	
		Es	2,0	1,4	0,7	1,0	1,0	0,9	0,5	0,4	50,0	
		SOL	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	
		D	1,9	0,8	0,1	0,9	1,1	1,2	0,8	0,6	40,0	
	LP II	Neinokulirana obravnavanja/ Neinokulirana kontrola	Bj	2,1	1,9	1,1	0,7	0,4	0,4	0,3	0,6	0,0
			Sa	2,5	1,9	0,6	0,6	0,4	0,6	0,3	0,6	0,0
			Es	1,7	1,4	1,2	1,0	0,5	0,5	0,4	0,9	10,0
SOL			1,1	1,1	0,9	0,6	0,7	0,8	0,6	0,7	0,0	
D			2,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Inokulirana obravnavanja/ Inokulirana kontrola		Bj	2,3	0,8	0,6	1,1	1,5	1,4	1,3	0,9	40,0	
		Sa	2,3	1,1	0,4	1,0	0,5	0,5	0,3	0,5	20,0	
		Es	2,4	1,1	0,8	1,0	1,0	1,0	0,8	0,8	40,0	
		SOL	1,5	0,7	0,8	1,0	0,9	0,8	0,9	1,0	0,0	
		D	1,8	0,8	0,3	0,9	0,6	0,7	0,6	1,0	20,0	
Inokulirana obravnavanja/ Neinokulirana kontrola		Bj	2,4	1,3	0,4	1,1	2,2	2,0	1,5	0,7	40,0	
		Sa	2,4	1,8	0,3	1,1	0,8	0,7	0,3	0,4	20,0	
		Es	2,5	1,7	0,5	1,0	1,5	1,4	1,0	0,6	40,0	
		SOL	1,5	1,1	0,6	1,0	1,3	1,2	1,0	0,8	0,0	
		D	1,9	1,2	0,2	0,9	0,9	0,9	0,7	0,8	20,0	
LP III		Neinokulirana obravnavanja/ Neinokulirana kontrola	Bj	2,2	2,5	1,1	1,6	2,0	1,0	2,5	0,6	30,0
			Sa	2,3	2,0	0,7	1,3	1,5	0,8	1,0	0,1	0,0
			Es	2,3	2,7	0,9	2,2	3,8	1,2	1,1	2,0	10,0
	SOL		0,9	1,2	0,6	0,7	0,3	0,4	0,0	0,3	10,0	
	D		1,2	1,5	0,0	0,4	0,3	0,2	0,0	0,0	10,0	

Slika 19: Vpliv alternativnih metod razkuževanja tal na rast in rodnost jagod, zaplevalejnost ter na AM in DSE kolonizacijo korenin jagod v inokuliranih in neinokuliranih obravnavanjih v primerjavi z inokulirano in neinokulirano kontrolo v treh lončnih poskusih

(rdeča polja – statistično značilno izrazito boljše od kontrole - \*\*; oranžna polja - statistično značilno boljše od kontrole - \*; rumena polja – rezultati se statistično ne razlikujejo od kontrole; svetlo siva - statistično značilno slabša od kontrole - \*; temno siva - statistično značilno izrazito slabša od kontrole - \*\*)

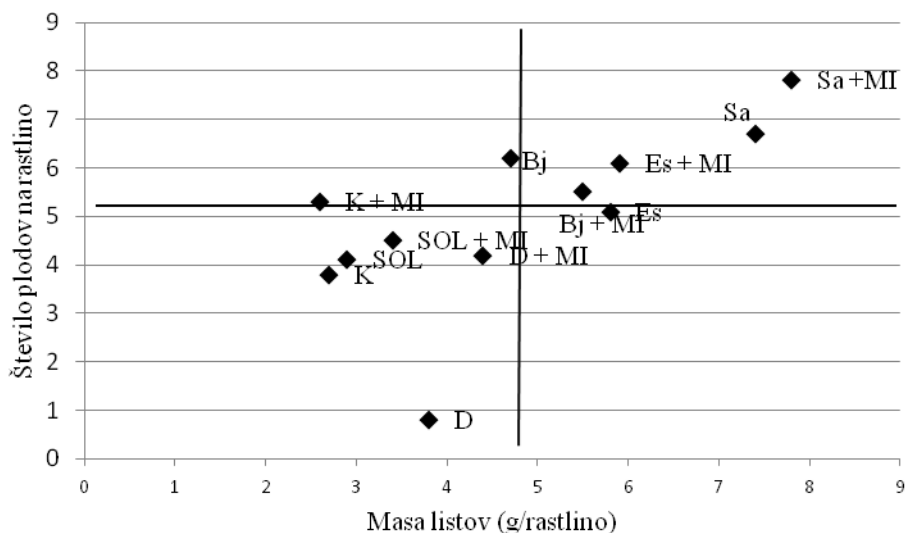
Figure 19: The effect of alternative methods of soil disinfection on growth and yield of strawberries, weeds and the AM and DSE colonization of strawberry roots in the inoculated and inoculated treatments compared to the inoculated control and neinokulirano in three pot experiments

(red - statistically significantly much better than the control - \*\*; orange - significantly better than the control - \*, yellow - the results are not statistically different from the control, light gray - significantly worse than the control - \*; dark gray - statistically significantly more worse than the control - \*\*)

Medsebojni vpliv mikorizne kolonizacije, listne mase (oz. števila listov v poljskem poskusu) in števila plodov smo preučevali tudi z linearno regresijsko funkcijo.

Povezavo med spremenljivkami smo ovrednotili s koeficientom korelacije. V poljskem in vseh lončnih poskusih smo ugotovili pozitivno korelacijo med rastjo in rodnostjo (Primer LP I - Slika 20). Tudi v tej primerjavi sta najvišjo vrednost dosegli obravnavani Sa+MI in Sa. Medsebojni vpliv mikorizne kolonizacije (F%) in rasti (masa listov) smo s 95 % verjetnostjo lahko potrdimo le v LP III. Povezava med ostalimi parametri mikorizne kolonizacije in rastjo (maso listov) ni bila dokazana. V povezavi med rodnostjo (število plodov) in parametri kolonizacije (F% in M%) smo pozitivno korelacijo ugotovili le v LP I (LP I – Slika 21 in Slika 22) in v LP III.

V LP I in LP III je rodnost (število plodov) v zelo velikem deležu (F%: LP I -57,7% in LP III -70,7%; M%: LP I - 56,8% in LP III - 72,1%) pojasnjena s frekvenco in intenziteto mikorize.



Slika 20: Korelacija med številom plodov na rastlino in maso listov v LP I

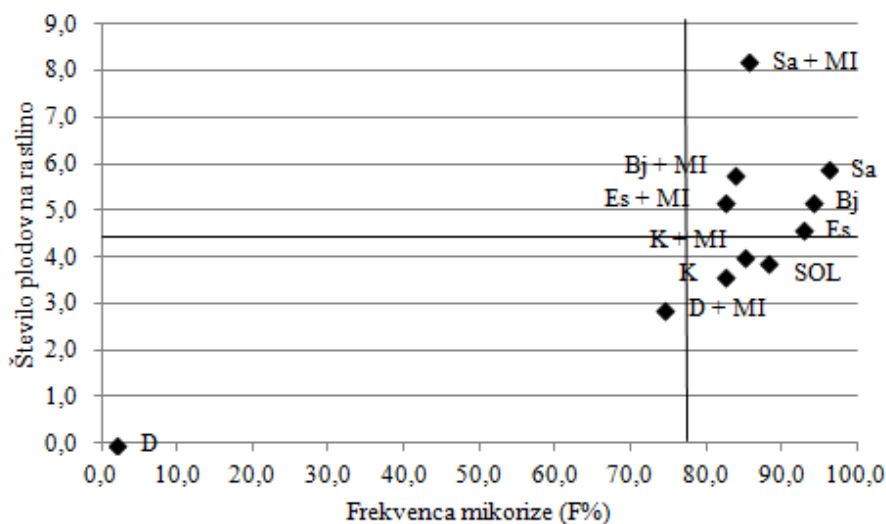
Pearsonov koeficient  $R = 0,66$  pri  $p < 0,05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola, - MI = brez mikoriznega inokuluma; + MI = z mikoriznim inokulumom)

Figure 20: The correlation between the number of fruit per plant and the mass of the leaves in LP

Pearson's coefficient  $R = 0.66$  at  $p < 0.05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control; -MI = uninoculated; +MI = inoculated with mycorrhizal inoculum)



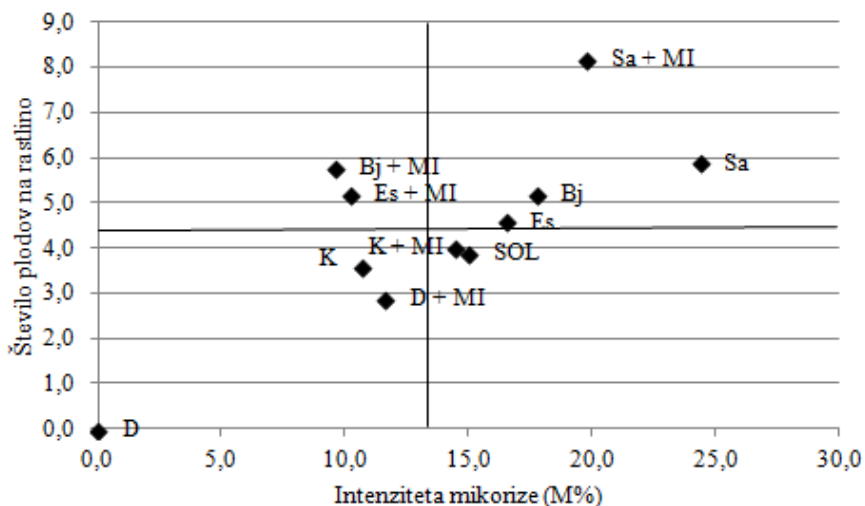
Slika 21: Korelacija med številom plodov na rastlino in frekvenca mikorize (F%) v LP I

Pearsonov koeficient  $R = 0,76$  pri  $p < 0,05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola, -MI = brez mikoriznega inokuluma; +MI = z mikoriznim inokulumom)

Figure 21: The correlation between the number of fruits per plant and the frequency of mycorrhiza in the LPI  
 Pearson's coefficient  $R = 0.76$  at  $p < 0.05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control; -MI = uninoculated; +MI = inoculated with mycorrhizal inoculum)



Slika 22: Korelacija med številom plodov na rastlino in intenziteto mikorize (M%) v LP I

Pearsonov koeficient  $R = 0,75$  pri  $p < 0,05$

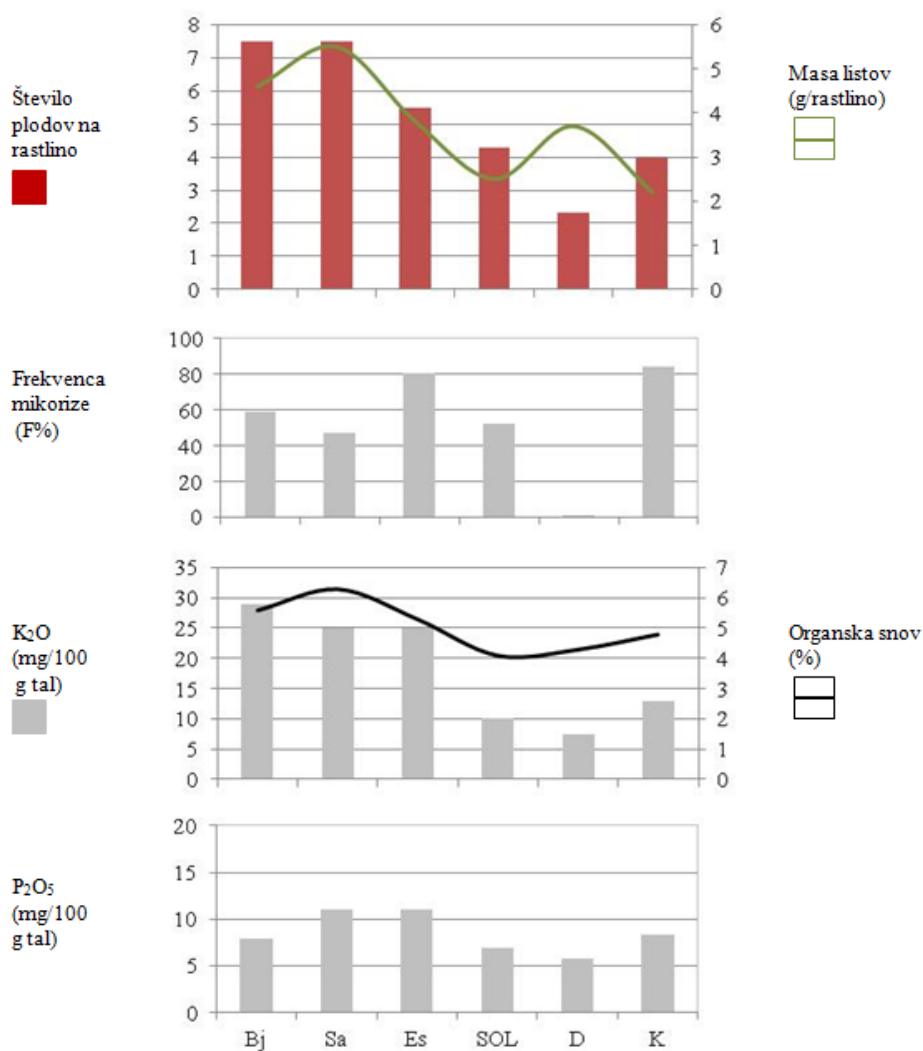
(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola, -MI = brez mikoriznega inokuluma; +MI = z mikoriznim inokulumom)

Figure 22: The correlation between the number of fruits per plant and the intensity of mycorrhiza in LP I  
 Pearson's coefficient of  $R = 0.75$  to  $p < 0.05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alb*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarization; D = dazomet; K = control; -MI = uninoculated; +MI = inoculated with mycorrhizal inoculum)

### 5.3.3 Medsebojni vplivi merjenih parametrov

Z različnimi metodami razkuževanja smo v tla ali substrate vnesli različne količine hranil in organske snovi, ki so vplivali na rast in pridelek jagod, delno pa tudi na kolonizacijo z mikoriznimi glivami. Ker smo analizo substratov po obiranju izvedli le v LP II v obravnavanjih brez dodanega MI, smo vpliv alternativnih metod na posamezne parametre lahko spremljali le v tem poskusu. Največje število plodov in maso listov smo dosegli v obravnavanju z biocidnimi rastlinami. Iz primerjav med posameznimi grafikoni (Slika 23) lahko sklepamo, da sta parametra rasti in rodnosti jagod v veliki meri odvisna od deleža organske snovi ter količine K ter P v tleh. Mikorizna kolonizacija (F%) na rast in pridelek ni imela bistvenega vpliva, saj je bila pri višjih vsebnostih P in K (biocidne rastline), frekvenca mikorize manjša.



Slika 23: Vpliv dostopnega P in K ter organske snovi in frekvence mikorize na število plodov in listno maso jagod v obravnavanjih brez mikoriznega inokuluma v LP II

Figure 23: Influence of available P and K, and organic matter and frequency of mycorrhiza on fruit number and mass of leaves in uninoculated treatment in LP II

## 6 RAZPRAVA

Rezultatov vpliva posameznih tehnoloških ukrepov v kmetijski pridelavi na fiziologijo in morfolologijo pridelovanih rastlin je malo, še manj pa je raziskav vpliva tehnoloških ukrepov na življenjski prostor rastline oz. na organizme, ki živijo v simbiozi z gojenimi kmetijskimi rastlinami.

V naši raziskavi smo ugotovili ugoden ali nevtralen vpliv, v nekaterih primerih pa tudi negativen vpliv zelenega gnojenja z biocidnimi in nebiocidnimi rastlinami ter solarizacije na rast in rodnost jagod ter razvoj koristnih mikoriznih gliv v tleh. Biofumigacija in solarizacija, kot dve izmed najbolj perspektivnih alternativnih metod razkuževanja tal, lahko kot del kolobarja skrajšata trajanje tradicionalnega kolobarja ter s tem pripomoreta k večji rodovitnosti tal. Poleg organske snovi in založenosti s hranili vplivata tudi na ugodno razmerje med koristnimi in škodljivimi talnimi MO.

### 6.1 Alternativne metode razkuževanja tal in založenost s hranili

Z zaoravanjem biocidnih in nebiocidnih rastlin v tla vnesemo organsko snov, zato ta ukrep imenujemo tudi zeleno gnojenje (Lazzeri in sod., 2009). Zeleno gnojenje s križnicami sodi med alternativne metode, ki ima poleg vpliva na škodljive talne organizme tudi veliko hranilno vrednost za gojene kmetijske rastline. Bj in Sa sta rastlini, ki imata značilen dušični cikel, pri katerem je višek izločanja dušika od 30 do 50 dni po zaoravanju, zato je N iz zaorane rastlinske snovi pomemben za sledečo kulturo (Smith in sod., 2004; Marchetti in sod., 2008). V našem poljskem poskusu smo z zaoravanjem Bj v tla vnesli 4,1 kg organske snovi na m<sup>2</sup>, s Sa 2,3 kg organske snovi na m<sup>2</sup>, z Es 3,2 kg organske snovi na m<sup>2</sup> in z Vf 5,7 kg organske snovi na m<sup>2</sup>, podobno kot v poljskih poskusih drugih raziskovalcev in uporabnikov biofumigacije (Lazzeri in sod., 1999; Lazzeri in Manichi, 2001). Kljub temu, da smo v poljskem poskusu s Sa v tla vnesli najmanj organske snovi v primerjavi z Bj in Es, je na pridelek v prvem in drugem letu Sa najugodnejše delovala. Vpliv Sa na pridelek je bil največji tudi v lončnih poskusih. Masa dodanih rastlin na volumen zemlje je bila v lončnih poskusih večja. V primerjavi s poljskim poskusom, pri Sa kar za 5 krat. Po zaključenem drugem lončnem poskusu je bilo v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami v substratu od 10 do 31 % več organske snovi kot v kontroli. V primerjavi s kontrolo je bil večji tudi delež skupnega N, dostopnega K in dostopnega P, z izjemo v obravnavanju Bj. Količina organske snovi v substratu je bila, v primerjavi s količino organske snovi v zemlji pred tretiranjem, povečana tudi v obravnavanjih SOL, D in K, kar je bilo verjetno posledica gostega koreninskega sistema jagod, ki je prepletal celotno koreninsko grudo odvzetega vzorca. Količina dostopnega kalija je bila v obravnavanjih SOL, D in K majhna zaradi porabe jagod za rast in pridelek. V obravnavanju z dazometom je bila količina dušika v substratu enaka kot v obravnavanju z Bj.

Dazomet nedvomno vpliva na večji pridelek jagod s svojim biocidnim in hranilnim delovanjem. Po uporabi dazometa je v tleh prisotna večja količina dušika kot v kontrolnih obravnavanjih (Harris, 1991; Eitel, 1995). Glede na to, da je bilo delovanje biocidnih rastlin na AM, v primerjavi s kontrolo nevtralnno ali delno ugodno, sklepamo, da je na rast in pridelek v naših poskusih v največji meri vplivala organska snov oz. hranila, ki so se sproščala iz biocidnih rastlin. Pri sprejemanju makro in mikroelementov v rastlino imajo

nedvomno velik pomen mikorizne glive. Paraskevopoulou-Paroussi in sod. (1997) so ob meritvah z AM inokuliranih jagod na izrazito s P slabo založenih tleh, pri mikoriznih rastlinah, v primerjavi z nemikoriznimi, ugotovili povečano suho snov, povečano količino P v listih, večje število in velikost listov ter večje število poganjkov in živic. Koncentracija K, Ca in Mg je bila v vseh obravnavanjih enaka, ne glede na stopnjo mikorizne kolonizacije. Soodvisnost živih in neživih dejavnikov tal se izrazi v razmerju med AM in P. Večja založenost tal s P ima negativen vpliv na AM, zato je v nasadih potrebno zmerno gnojenje (Vestberg in sod., 2002; Stewart in sod., 2005). Mikorizna kolonizacija tkivno vzgojenih sadik jagod niha glede na dodano količino P. Nemikorizne rastline za isti pridelek potrebujejo več P kot mikorizne rastline (Sharma in Adholeya, 1994).

V drugem lončnem poskusu, kjer smo analizirali vzorce substratov pred in po poskusu, je bilo razmerje med založenostjo s P in frekvenco mikorize zelo izrazito. V obravnavanjih, kjer je bil delež P večji, je bila frekvenca mikorize manjša in obratno.

V poljskem poskusu smo v tla največ organske snovi vnesli v obravnavanju Vf, vendar se pridelek od obravnavanj z biocidnimi rastlinami, ki so imele manjšo maso, ni statistično razlikoval. Frekvenca mikorize v obravnavanju Vf je bila najmanjša. Glede na to, da gnojenje statistično značilno ne zmanjša stopnje kolonizacije z mikoriznimi glivami, tudi zaoravanje organske snovi (zeleno gnojenje) ne bi smelo vplivati na zmanjšanje mikoriznosti (Williams in sod., 1992). Ker biocidne rastline zavirajo rast škodljivih organizmov, je vključevanje biocidnih rastlin v kolobar najboljše tehnološka rešitev (Kirkegaard, 1996; Charron in Sams, 1999; Gengotti, 2001). K večji učinkovitosti izrabe organske snovi v tleh pripomore solarizacija, ki vpliva na pospešeno mineralizacijo organske snovi, kar ima neposreden vpliv na rastline.

## **6.2 Vpliv alternativnih oblik razkuževanja tal na parametre rasti in rodnosti jagod**

Intenzivnost rasti in rodnost oz. pridelek sta najbolj vidna parametra uspešnosti gojenja vsake kmetijske kulture. Na rast in rodnost jagod imajo velik vpliv sorta, tehnologija, klimatske razmere, tip tal, zdravstveno stanje rastlin, mikroorganizmi v tleh in drugo.

### **6.2.1 Biofumigacija**

Kolobarjenje z ustreznimi kmetijskimi rastlinami je eden izmed tehnoloških ukrepov, ki v pridelavi jagod predstavlja učinkovito razkuževanje tal. Z rastlinami za zeleni podor kot so indijska trava (*Sorghastrum avenaceum*), sudanska trava (*Sorghum bicolor* x *S. sudanese*), grašica (*Vicia villosa*), žametnica (*Tagetes patula*), ajda (*Fagopyrum esculentum*), okrasna trava - vejičasto proso (*Panicum virgatum*) in dr., vplivamo na rodovitnost tal in s tem neposredno na večji pridelek ter na talne MO, ki zmanjšujejo negativen vpliv ponovnega sajenja jagod na isto parcelo (avtotoksičnost). Pozitivne povezave med rastjo in rodnostjo jagod sicer ne moremo vedno dokazati (Seigies in Pritts, 2006). Rastline za zeleni podor na rodnost vplivajo posredno, preko fizikalnih lastnosti tal, vlage, prisotnosti škodljivih organizmov in dr. V primerjavi z biocidnimi rastlinami ima razkuževanje tal z MB večji, hitrejši in bolj neposreden vpliv na rast gojenih rastlin (Seigies in Pritts, 2006; Lazzeri in sod., 1999, 2009).

V lončnih poskusih je v povprečju na rast in število plodov, v primerjavi s kontrolo in kemičnim razkuževanjem, imela največji vpliv Sa. Učinek delovanja je bil povečan ob dodajanju MI. Iz tega lahko sklepamo, da učinek delovanja Sa ni povezan le z organsko snovjo, ampak tudi z vsebnostmi posameznih GSL (Arcuti in sod., 2001). Vpliv Sa se je le malo razlikoval od vpliva Es. V poljskem poskusu je Bj od biocidnih rastlin imela najmanjši vpliv na rast in rodnost. V lončnih poskusih je Bj zelo različno delovala na parametre rasti in rodnosti, vendar od Sa in Es ni bistveno odstopala. Podatki iz naših poskusov med seboj niso popolnoma primerljivi, ker so med posameznimi poskusi določene razlike (čas sajenja posameznih poskusov; izpad obravnavanja SOL+MI v prvem lončnem poskusu; substrata za mikorizni inokulum za LP II in LP III sta bila z rastlinami koruze posejana daljše obdobje; tretji lončni poskus je bil brez obravnavanj z MI). Podatki naših poskusov so tudi težko primerljivi s podatki v literaturi, kjer so med biocidnimi rastlinami v preizkušnji v glavnem selekcije Bj z visokim deležem GSL za biofumigacijo. Es zasledimo le v poskusu Curto in sod. (2006), ki so v svoje poskuse, z namenom zatiranja ogorčic, vključili Es. Ugotovili so, da je bil pridelek korenčka po kolobarjenju z Es večji od pridelkov v kolobarju z *Vicia villosa*, *Crambe abyssinica*, *Raphanus sativus*, Bj in kontrolo. Statistično se pridelek ni razlikoval le od Bj. V našem poljskem poskusu se rast jagod, ki smo jo ovrednotili s številom izraslih živic in številom listov na rastlino, med obravnavanji z biocidnimi rastlinami in bobom, statistično ni razlikovala. Tudi rodnost, ki smo jo ovrednotili s številom cvetov in plodov, maso pridelka na rastlino in povprečno maso plodu, se med obravnavanji ni razlikovala. Med vsemi obravnavanji z rastlinami za zeleni podor, v poljskem poskusu v prvem in drugem letu, v primerjavi s kontrolo, ni bilo statistično značilnih razlik.

### 6.2.2 Solarizacija

V lončnih poskusih je bila masa listov iz obravnavanja SOL enaka kontroli. V primerjavi z ostalimi obravnavanji, razen v LP III, je bila rast najmanjša v obravnavanjih SOL. Razlog za manjšo bujnost rastlin iz obravnavanj SOL bi lahko bil v manjši količini hranil, v primerjavi z biofumigacijo, kjer smo dodali organsko snov. Obstaja pa tudi možnost, da razkuževanje zemlje (v našem poskusu toplotna obdelava), spremeni kemično sestavo tal in povzroči sproščanje za rastlino strupenih elementov, npr. Mn (Wolf in sod., 1989). V poljskem poskusu smo v obravnavanjih solarizacije s črno ali prozorno folijo, ne glede na trajanje prekrivanja, v primerjavi z ostalimi obravnavanji, dosegli najmanjši pridelek, ki pa se statistično ni razlikoval od ostalih pridelkov. Kljub dejstvu, da je bila kolonizacija korenin z mikoriznimi glivami v obravnavanjih s črno folijo največja, je bil pridelek prav v teh dveh obravnavanjih najmanjši. Število listov v obravnavanju SOL v poljskem poskusu je bilo v povprečju manjše kot pri biofumigaciji ali dazometu ter enako kontroli.

V lončnih poskusih je bilo število plodov v obravnavanju SOL primerljivo ali enako K, v primerjavi z biocidnimi rastlinami pa nekoliko manjše. Na osnovi rezultatov sklepamo, da je na število plodov v našem poskusu imela največji vpliv organska snov, ki smo jo vnesli z rastlinami za zeleni podor. Solarizirana zemlja dodatnih hranil v obliki organske snovi ni dobila. V poljskem poskusu je bil pridelek pri kontroli enako velik kot na solariziranih površinah, kar lahko pripišemo masi plevelnih rastlin, ki so se v manjši meri razrasle na poskusnih parcelah in po mineralizaciji prispevale k dodatni založenosti zgornje plasti tal s

hranili. V lončnih poskusih dodatne organske snovi v obliki plevelnih rastlin ni bilo, zato je bil pridelek v obravnavanju K v lončnih poskusih izrazito manjši v primerjavi z obravnavanji z biocidnimi rastlinami. Podobni so bili rezultati Baruzzija in sod. (2000), ki so ugotovili, da kemično razkuževanje z MB in mikorizacija z glivami iz rodu *Glomus* (v primerjavi z nerazkuženimi in nemikoriziranimi obravnavanji) niso dali statistično značilnih razlik v parametrih rasti gojenih rastlin. Statistično značilni učinki so bili doseženi samo ob dodajanju organske snovi. Učinki solarizacije so v razmerah zmernega pasu in na težjih tleh manjši kot v mediteranskem območju ali na lahkih peščenih tleh, kjer je mogoče doseči izjemno visoke temperature in kjer so že nesolarizirana tla močno segreta v primerjavi s tlemi zmernega pasu (Benlioglu, 2005). Pridelki jagod v poskusih v osrednji Italiji so bili pri solarizaciji v povprečju večji od kontrole, vendar ne večji kot v obravnavanjih z MB (Baruzzi in sod., 1997; Rosati, 2002; Arcuti in sod., 2001; Rieger in sod., 2001; Palermo in sod., 2012). S solarizacijo so v nekaterih poskusih dosegali z MB primerljive rezultate, vendar ne boljše kot z mešanico kloropikrina in diklorpropena, ki jo vse pogosteje uporabljajo namesto MB. Solarizacija je imela na pridelek večji ali podoben vpliv kot dazomet, vendar je bila povprečna masa plodov pri kemičnem razkuževanju večja kot pri solarizaciji (D'Anna, 2005). V Izraelu in na Siciliji so s solarizacijo dosegli boljše pridelke jagod kot z MB (Razik, 1989; Prinzivalli in sod., 2001). Solarizacija vpliva tudi na izračanje večjega števila živic in na večjo maso plodov (Stapleton in DeVay, 1984).

V Sloveniji v pridelavi jagod dazomet ni bil nikoli dovoljen. Občasno so ga pridelovalci uporabljali za razkuževanje tal za predkulture. Delovanje dazometa je nestabilno, zato se v tujini za kemično tretiranje tal za nasade jagod uporabljajo druge aktivne snovi, ki v kombinaciji s primerno odbranimi sortami vplivajo na povečanje pridelka (od 16 do 50 %) in bujnejšo rast v primerjavi z nerazkuženimi tlemi (Chandler in sod., 2001; Faedi in sod., 2002; Particka in Hancock, 2005). Objavljeni oz. predstavljeni rezultati o izredno ugodnem vplivu kemičnih snovi na pridelek pri pridelovalcih vplivajo na večjo uporabo kemičnih sredstev in s tem posredno na večjo degradacijo tal. Ekološko osveščeni tehnologi priporočajo nekemično tretiranje tal s paro, solarizacijo, pridelavo izven tal, biofumigacijo in razkuževanje z drugimi metodami (Baruzzi in sod., 1997; Ajwa in sod., 2003; Lopez- Aranda in sod., 2009). V nekaterih poskusih so ugotovili, da razkuževanje izboljša rast rastlin, vendar to vedno ne vodi k večjemu pridelku (Seigies in Pritts, 2006). V našem poljskem poskusu je bilo število listov na rastlino v obravnavanju z dazometom statistično značilno večje od kontrole in ostalih obravnavanj, razen od Sa in Es. Uporaba dazometa ni vplivala na količino in kakovost (masa) plodov. V lončnih poskusih je bilo delovanje dazometa zelo močno, zato smo količino dazometa v LP III prepolovili. V primerjavi s poljskim poskusom, kjer je dazomet vplival na večji pridelek, je v lončnih poskusih dazomet vplival na izrazito zmanjšanje pridelka. Ob dodajanju MI se je delovanje dazometa v lončnih poskusih povsem izničilo.

### 6.2.3 Inokulacija z AM glivami

Rastline, ki imajo z AM kolonizirane korenine, so bolj učinkovite v pridobivanju hranil in vode, manj občutljive na bolezni ter bolj rodne v danih rastnih razmerah kot nemikorizne rastline (Smith in Read, 1997). Posledično je listna površina mikoriznih rastlin večja (Branzanti in sod., 1998; Baruzzi in sod., 2000). Mikorizna kolonizacija kmetijskih rastlin



lahko pomembno vpliva na rast in sprejemanje hranil ter posredno na pridelek. Pogosto je vpliv AM na pridelek nejasen. Dodajanje mikoriznih inokulumov sicer vpliva na večjo mikorizno kolonizacijo, ki pa se vedno ne izrazi v večjem pridelku (Regvar in sod., 2003; Gosling in sod., 2006). V večini poskusov, kjer so preučevali vpliv mikoriznih gliv na rast in rodnost jagod, je bil vpliv mikoriznih gliv na rastline ugoden. Inokulirane rastline so imele večjo maso korenin in poganjkov, večji pridelek in večje plodove (Paraskevopoulou-Paroussi in sod., 1997; Matsubara in sod., 2004). V več poskusih z več sortami jagod in več inokulumi so ugotovili, da v ekološki pridelavi nobeden od inokulumov, v primerjavi s konvencionalno pridelavo, ni vplival na povečanje pridelka. Inokulumi so vplivali na kolonizacijo korenin z mikoriznimi glivami, ne pa na sprejemanje hranil v rastline (Muramoto, 2003; Bull in sod., 2005).

Učinek mikoriznih gliv na rast in razvoj jagod je lahko tudi negativen (Taylor in Harrier, 2001; Stewart in sod., 2005). Masa poganjkov tkivno vzgojenih jagod je, v primerjavi z neinokuliranimi rastlinami, statistično značilno manjša pri vseh rastlinah, ki so bile kolonizirane npr. z mikorizno glivo *Scutellospora* sp. Vpliv posameznih gliv (*G. rosea*, *G. clarum*, *Scutellospora* sp.) na sprejemanje hranil, maso korenin in kolonizacijo je zelo različen, od negativen do pozitiven. V vseh koloniziranih rastlinah je običajno večja le količina P. Mikoriza sicer lahko vpliva na bujnejšo rast, vendar ne na večji pridelek (Vestberg in sod., 2000, 2002; Bull in sod., 2005). V nasadih jagod, ki so na slabih zemljiščih, mikoriznih gliv praktično ni ali je njihova prisotnost zelo omejena. Povprečna gostota spor v nasadih s konvencionalno pridelavo je med 340 in 1710 spor na liter zemlje, v ekoloških nasadih pa 4760 spor. Na koreninah je prisotnih med 6 in 8 vrst gliv, najpogosteje *Glomus mosseae*, *G. claroideum*, *G. clarum*, *G. hoi*, *G. geosporum* in *G. scintillans*. Mikoriza sicer vpliva na bujnejšo rast, vendar med pridelkom in mikorizno kolonizacijo ni potrjenih nikakršnih povezav. Potrjena pa je negativna povezava med količino P in učinkovitostjo mikorize (Vestberg in sod., 2002), kar lahko potrdimo tudi z rezultati našega drugega lončnega poskusa.

Iz rezultatov poljskega poskusa ne moremo trditi, da sta bili rast in količina pridelka jagod odvisni oz. povezani s frekvenco ali intenziteto mikorize. Hipotezo, da mikorizna kolonizacija vpliva na večjo rast in rodnost smo le delno potrdili. V lončnih poskusih smo medsebojni vpliv mikorizne kolonizacije (F%) in rasti (masa listov) lahko potrdili le v LP III, medsebojni vpliv rodnosti, F% in M% pa v LP I in LP III. AM glive so obligatni biotrofi, kar pomeni, da so odvisni od svojega gostitelja. Običajno so koristni za rastlino, vendar lahko v določenih pogojih vplivajo na manjšo rast. V zgodnji fazi kolonizacija AM lahko povzroči parazitizem in ne simbiozo (Schönbeck, 1979).

Relativno majhen vpliv inokulacije z MI na mikorizno kolonizacijo jagod v primerjavi z neinokulirano kontrolo je bil lahko posledica velike prisotnosti mikoriznih gliv v zemlji, ki je predstavljala kontrolo in je bila sestavni del vseh substratov. Poznano je, da je inokulacija z AM učinkovita predvsem takrat, kadar naravne mikorizne glive niso prisotne ali je njihovo število zelo majhno (Azcón-Aguilar in Barea, 1997).

Razlike v rasti med obravnavanji z ali brez MI si lahko razlagamo ne le z delovanjem mikoriznih gliv, ampak tudi z vplivom samega naravnega inokuluma, ki je v lončnih poskusih volumensko predstavljal pomemben delež substrata.

### 6.3 Zapeleveljenost

V jagodah poleg bolezni, največji problem predstavljajo pleveli. Zatiranje s herbicidi je zaradi nujne selektivnosti pripravkov težko in drago. V IP in EKO pridelavi neposredna uporaba herbicidov ni dovoljena. Sajenje jagod na folijo omeji zapeleveljenost na velikem delu nasada, vendar predstavlja zapeleveljenost sadilnih mest še vedno problem. Večina kemičnih sredstev za razkuževanje tal deluje tudi herbicidno. Novejša kemična sredstva so, v primerjavi z MB, bolj selektivna in manj učinkovita. V našem poljskem in lončnih poskusih je bil dazomet, v primerjavi z alternativnimi metodami, pri zatiranju plevelnih rastlin učinkovit. Zapeleveljenost sadilnih mest jagod v našem poljskem poskusu se bistveno ni razlikovala od povprečne zapeleveljenosti v lončnih poskusih.

Med posameznimi lončnimi poskusi in obravnavanji so bile razlike v zapeleveljenosti velike. Razlike med posameznimi lončnimi poskusi so verjetno izhajale iz različnih obdobji izvajanja poskusov. Dodajanje MI je v vseh obravnavanjih, razen v kontroli, v povprečju vplivalo na zmanjšanje plevelnih rastlin, vendar razlike niso bile statistično značilne. V povprečju je bila največja zapeleveljenost v drugem lončnem poskusu, najmanjša pa v tretjem. AM glive zmanjšajo rast plevelov (Cameron, 2010; Rinaudo in sod., 2010). Manjša rast plevelov je mogoče posledica alelopatskega vpliva AM gliv, zaradi katerega so plevelne rastline slabše prehranjene. Manjša rast plevelnih rastlin zaradi AM je bila dokazana tudi pri beli metliki (*Chenopodium album*) in navadni kostrebi (*Echinochloa crus-galli*), ki v svetu sodita v skupino desetih najbolj agresivnih plevelnih rastlin. Jordan in sod. (2000) so AM glive poimenovali potencialni živi uničevalci plevelov (weed killers). Negativen vpliv na rast je bil izrazit predvsem pri plevelnih rastlinah, ki niso gostiteljice AM gliv. Po mnenju Camerona (2010), je vloga AM kot zatiralca plevelov v agroekosistemih zelo pomembna.

#### 6.3.1 Biofumigacija in zapeleveljenost

Kolobarjenje z rastlinami za zeleno gnojenje ima izrazit vpliv na fizikalne lastnosti tal in povečano zapeleveljenost (Lazzeri in Manichi, 2001). Vpliv posameznih rastlin (Bj) na rast plevelov je na prostem (polje) lahko minimalen, v zavarovanem prostoru (lončni poskus) pa lahko popolnoma zavrejo rast plevelnih rastlin (Smith, 2001). Mlade plevelne rastline propadejo zaradi toksičnega učinka GSL (Schreiner in sod., 2001).

V lončnih poskusih je bila v povprečju zapeleveljenost največja pri kontroli. V prvem lončnem poskusu je bila zapeleveljenost v obravnavanjih Bj in Sa ob dodanem MI manjša, v ostalih obravnavanjih pa se je ob dodatku MI zapeleveljenost povečala. Zaradi statistične neznačilnosti razlik med inokuliranimi in neinokuliranimi obravnavanji menimo, da razlog za manjše zapeleveljenosti obravnavanj z inokulumom torej ne more biti v inokulumu. V drugem lončnem poskusu je bila zapeleveljenost največja pri Es, nato Bj in najmanjša pri Sa. V tem poskusu se je z dodajanjem MI zapeleveljenost v vseh obravnavanjih zmanjšala, iz česar bi lahko sklepali, da MI zmanjšuje zapeleveljenost substrata ali da je bil v mikoriznem inokulumu, ki je predstavljal velik delež posameznega substrata, manjši potencial plevelnih rastlin (semenski pleveli). V tretjem lončnem poskusu so bili podatki med obravnavanji zelo izenačeni, vendar je bila tudi v tem poskusu zapeleveljenost najmanjša pri Sa. V poljskem poskusu so bila obravnavanja z biocidnimi rastlinami bolj

zapleveljena od ostalih obravnavanj. Število plevelov se je v vseh obravnavanjih z rastlinami za podor zelo povečalo. Največja zapleveljenost je bila v obravnavanju z bobom, najmanjša pa pri Sa. V primerjavi s kemično razkuženimi površinami (npr. z MB), je bila zapleveljenost v poskusih v Italiji največja pri nebiocidnih pokrovnih rastlinah in nato pri križnicah (npr. brokoli in gorjušica). Razlike v zapleveljenosti so lahko tudi nekajkratne (Lazzeri in Manichi, 2001). Iz vseh naših poskusov lahko povzamemo, da je izražanje plevelov preprečevala le Sa, s čimer lahko le delno potrdimo hipotezo, da biofumigacija zmanjšuje zapleveljenost. Mattner in sod. (2008) so v poljske poskuse jagod vključili biocidni rastlini oljno repico (*Brassica rapa*) in ogrščico (*B. napus*). Po zaoravanju biocidnih rastlin niso zaznali ITC, vendar je bila zapleveljenost jagod vseeno za 40 % manjša. Predvidevali so, da so na zmanjšanje kaljenja plevelnih rastlin in na delno zmanjšanje škodljivih gliv vplivale druge snovi, npr. nitrili ali drugi biološki mehanizmi, ki so imeli vlogo v biofumigaciji. Ključ za izboljšavo učinka biofumigacije je v optimizaciji izločanja ITC iz rastlinskega materiala.

### 6.3.2 Solarizacija in zapleveljenost

Učinkovitost solarizacije je močno odvisna od njenega trajanja. Od 4 do 6 tedenska solarizacija zmanjša zapleveljenost za 80 do 95 % in vpliva na večjo rast in pridelek (Ioannou N in Ioannou M, 2002). V lončnih poskusih je imela toplotna obdelava substratov na prisotnost plevelov večji učinek kot solarizacija v poljskem poskusu. Plevelov je bilo statistično značilno manj kot v kontroli. Učinek solarizacije s prozorno folijo je bil v poljskem poskusu dober, še posebno pri daljšem prekrivanju površin. Število plevelov v obravnavanjih s solarizacijo s prozorno folijo se statistično ni razlikovalo od obravnavanja, kjer smo tla kemično razkuževali z dazometom. Solarizacija s črno folijo pri zatiranju plevelov ni bila učinkovita, saj je bilo število plevelov enako številu plevelov na kontrolnih parcelah. Temperatura tal nad 45 °C preprečuje rast plevelov. Učinkovitost delovanja se povečuje s številom dni, ki presegajo temperaturni prag (Horowitz in sod., 1983). Debelina folije na skupno število plevelov nima bistvenega vpliva, dodana organska snov pa bistveno vpliva na priraščanje posameznih vrst plevelnih rastlin. Na prostem je učinkovita solarizacija do globine 10 cm (Palumbo in sod., 1999b). UV stabilizirane folije so obstojnejše in zato v borbi proti plevelom uspešnejše kot nestabilizirane (Gill in sod., 2009).

Med alternativna sredstva, ki vplivajo na plevelne rastline prištevamo vsa sredstva, ki so namenjena za zatiranje talnih MO. Pri solarizaciji zaradi visokih temperatur plevelne rastline neposredno po kaljenju propadejo (Schreiner in sod., 2001). Delovanje na plevelne rastline je učinkovito predvsem v kombiniranih alternativnih oblikah razkuževanja (npr. solarizacija in biofumigacija).

### 6.4 Mikorizna kolonizacija jagod in razkuževanje tal

Mikorizna kolonizacija jagod je odvisna od zunanjih, genetskih in tehnoloških dejavnikov (Branzanti in sod., 2002; Duncan, 2002; Vestberg in sod., 2002). Z vnosom velikih količin organske snovi se v tleh poleg hranil poveča tudi število MO. Število bakterij se je v poskusih Ramirez-Villapudra in Munnecke (1988) povečalo za 16 krat, število gliv pa se je zmanjšalo za 20 %. Izjema so bile glive *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. in aktomicete,

katerih število je ostalo nespremenjeno. Lazzeri in Manici (2001) sta v poskusih na prostem in v kontroliranem okolju (lonci) ugotovila, da zaorane ali dodane biocidne rastline vplivajo na povečanje skupne populacije gliv v primerjavi s kontrolo (brez podorin). 10 tednov po zaoravanju je bila skupna populacija gliv (škodljivih in neškodljivih saprofitskih gliv) za 200 do 600 % večja kot v kontroli. Istočasno se je v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami populacija škodljive glive *Pythium* sp. značilno zmanjšala.

Mikorizno kolonizacijo jagod smo spremljali v lončnih in poljskem poskusu. Glede na to, da se je zasnova poljskega poskusa delno razlikovala od zasnove lončnih poskusov in da je poljski poskus potekal na prostem, lončni pa v zavarovanem prostoru, so rezultati med seboj le delno primerljivi (Gosling in sod., 2006; Leandro in sod., 2007). Lončni poskusi so vključevali tista obravnavanja, ki so v poljskem poskusu izstopala po vplivu na rastline ali mikorizne glive. Povprečna mikorizna kolonizacija je bila v poljskem poskusu nižja kot v lončnih poskusih, povprečni pridelek oz. število plodov na rastlino in listna masa pa izrazito višja, kar je bilo posledica uporabe različnega sadilnega materiala. Temeljni razlog za razliko v stopnji mikoriznosti, ki je nastala v naših poskusih, je bil v razliki med naravnim okoljem in izoliranim okoljem rastlinjaka. V vzorcih iz vseh poskusov smo opazili predvsem arbuskule in hife, le redko vezikle, nikoli pa svitkov. Prisotni so bili tudi drugi mikrosklerociji, ki so predvidoma pripadali DSE, škodljivim glivam ali nepoznanim koreninskim endofitom. Razlog za majhno zastopanost veziklov je bil verjetno v tem, da se vezikli, ki predstavljajo založno strukturo, razvijejo po daljši uspešni povezavi glive in rastline. Vzorci v naših poskusih so bili odvzeti od 12 do 14 tednov po sajenju v poljskem poskusu in 7 tednov po sajenju v lončnih poskusih, ko se je med rastlinami in glivami šele začela vzpostavljati simbiotska povezava. Razlog za zgoden odvzem vzorcev je bil v tem, da je delovanje sredstev za razkuževanje tal največje neposredno po vkopavanju ali dodajanju. V poznejšem obdobju je možna remikorizacija tal, ki bi prikrila delovanje alternativnih metod na mikorizne glive. Tudi gostota arbuskulov je bila zaradi zgodnjega odvzema nizka. Veliko število arbuskulov je pokazatelj intenzivne izmenjave snovi med rastlinami in glivami, ki se pojavi po dolgotrajnejši kolonizaciji (Branzanti in sod., 2002). Podatki posameznih lončnih poskusov so prikazani ločeno, saj se stopnja kolonizacije spreminja tudi med posameznimi leti, izrazito pa je tudi spreminjanje mikoriznosti med letnimi časi oz. med različnimi fazami rasti rastline. Maksimalna mikorizna kolonizacija (med 50 in 70 %) je običajno na višku rasti (maj) (Branzanti in sod., 1998; Branzanti in sod., 2002; Scagel, 2003). Frekvenca mikorize jagod je bila v naših poskusih zelo velika, z izjemo v obravnavanju, v katerem smo uporabili dazomet. V poljskem poskusu je bila od 37,0 % do 55,5 %, v LP I in LP II brez dodanega MI pa od 47,3 % do 96 %. V obravnavanjih z dodanim MI je bila frekvenca mikorize večja. V tujih poskusih je bila frekvenca mikorize jagod po 8 tednih do 27 % (Niemi in Vestberg, 1992; Branzanti in sod., 1998; Branzanti in sod., 2002).

V lončnih poskusih smo polovici rastlin dodali naravni MI, ki je bistveno vplival na večjo mikorizno kolonizacijo rastlin. Kljub temu, da podatki med lončnima poskusoma I in II zaradi različnega obdobja izvajanja poskusov niso direktno primerljivi, smo zasledili podobne trende v merjenih parametrih (večja kolonizacija z AM v obravnavanjih z MI - F%, M%, A%). O vplivu mikoriznosti na rast rastlin je veliko različnih podatkov. Jagode

se na inokulacijo z AM odzivajo različno. Nekatere z inokulacijo pridobijo, druge izgubijo (Stewart in sod., 2005).

Inokulacija jagod z AM in PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) vpliva na večje število korenin ne glede na sorto. V kombinaciji s foliarnimi gnojili se število korenin in listna masa zmanjšata. To nakazuje na dejstvo, da MO pri črpanju hranil pripomorejo samo v neprehranjenih tleh. Odziv rastline na AM in PGPR je genetsko pogojen, saj se posamezne sorte na inokulacijo zelo različno odzovejo. Aplikacija AM in PGPR je imela v poskusu mnogo večji učinek na rast koreninskega sistema kot na rast poganjkov, zato se inokulacija ni vedno izrazila v povečani rasti rastlin, ampak je vpliva celo na zmanjšanje rasti (Gryndler in sod., 2002; Malusa in sod., 2006). Manjšo listno maso smo izmerili tudi v našem LP I v obravnavanju Es+MI, vendar manjša listna masa ni vplivala na manjšo rodnost.

#### **6.4.1 Vpliv biocidnih rastlin na mikorizno kolonizacijo**

Zaoravanje zmulčenih biocidnih rastlin v tla ali dodajanje zmletih biocidnih rastlin različnim substratom ima na mikorizno kolonizacijo pridelovane rastline negativen ali pozitiven vpliv. Schreiner in Koide (1993) sta ugotovila, da tudi nedotaknjene (nezmulčene) korenine gorjušice zavirajo kaljenje spor AM mikoriznih gliv. Koruza, ki so jo posejali za belo gorjušico, je bila manj kolonizirana in je imela manjši pridelek. Za predposevkom sončnic negativnega vpliva na mikorizne glive niso zaznali (Karasawa in sod., 2002). Pozitiven vpliv biocidnih rastlin na koristne MO (aerobne bakterije, koristne prostoživeče ogorčice, *Pseudomonas* spp. in aktinomicete) je bil potrjen v številnih poskusih (Scott in Kundsén, 1999; Riga, 2007; Mattner in sod., 2008). Fitotoksičnosti biocidnih rastlin se izognemo s sejanjem ali sajenjem sledeče kulture vsaj nekaj tednov po zaoravanju biocidnih rastlin (Scott in Kundsén, 1999).

V naše poskuse smo Bj vključili na podlagi literature (Harding, 2001; Lazzeri in Manichi, 2001), Sa na podlagi dejstva, da je v Sloveniji dokaj razširjena poljščina ter Es, ki se je v preteklosti na posameznih zelenjadarskih kmetijah na Primorskem (obalno območje) sejala v kolobarju s paradižnikom. Setev smo izvedli v optimalnih terminih, dosegli ustrezen sklop rastlin in jih zmulčili ter zaorali v obdobju, ko naj bi po navedbah v literaturi rastline dosegle največji delež GSL. Masa rastlin, ki smo jih vdělali v zemljo pri posameznih obravnavanjih, je bila zelo različna. V našem poljskem poskusu smo v tla zaorali podobne količine biocidnih rastlin kot v tujih poskusih (Lazzeri in Manichi, 2001). Biomasa rastlin za biofumigacijo, ki naj bi jo zaorali v tla naj bi bila med 70 in 90 t/ha, kar je približno od 10 do 20 t/ha suhe snovi, odvisno od pedoklimatskih razmer in načina pridelave biocidnih rastlin. K listni masi je potrebno dodati od 8 do 10 % mase koreninskega sistema. Po zaoravanju se v tla sprosti od 20 do 50  $\mu\text{mol}$  GSL/g suhe snovi (Lazzeri in sod., 2009). V našem poljskem poskusu je bila količina vnešenih skupnih GSL bistveno manjša, od 6,5 do 20,8  $\mu\text{mol}$  GSL/g suhe snovi v poljskem poskusu in od 6,4 do 16,8  $\mu\text{mol}$  GSL/g suhe snovi v lončnih poskusih. Ker smo v našem poljskem poskusu z Bj v tla vdělali manj GSL, smo količino dodane listne mase v lončnih poskusih povečali. Enako smo povečali tudi količino Sa in Es. V lončnih poskusih smo dodali zamrznjene biocidne rastline. Price in sod. (2005) so ugotovili, da se ITC po zamrzovanju ohranja v enakih razmerjih kot v svežem materialu. Kirkegaard (2001) je preizkušal sproščanje ITC

iz zelenih in zamrznjenih rastlin. Ugotovil je, da se pri zamrznjenih rastlinah poveča sproščanje ITC, zato so razvijali metode razgradnje celic in s tem povečanega izločanja ITC.

V lončne poskuse smo vnesli vedno enako količino organske snovi biocidnih rastlin, vendar različne količine GSL. V istih biocidnih rastlinah smo dobili različne GSL kot npr. Curto in sod. (2006). Razlike v koncentracij GSL so zelo velike tudi med sortami in deli rastlin, razlikujejo pa se tudi od načina pridelovanja (na prostem ali v rastlinjaku, gnojenje) (Rosen in sod., 2005; Kang in sod., 2006). V delovanju posameznih biocidnih rastlin na različne parametre mikoriznosti ter na rast in rodnost razlike nastanejo tudi zaradi načina izvajanja poskusov (poljski ali lončni), odvisne so od temperature tal, pokritosti tal s folijo, teksture tal (Price in sod., 2005). Poskus, ki sta ga izvajala Lazzeri in Manici (2001) je potekal na prostem in v loncih. V loncih je sistem zaprt, zato je bila izguba GSL v primerjavi s poljem manjša. V našem poskusu je bilo delovanje biocidnih rastlin v lončnih poskusih bolj izrazito. V poljskem poskusu smo v tla z biocidnimi rastlinami vnesli različne količine organske snovi in s tem različne količine GSL. Z zaoravanjem Bj smo v tla vnesli 18,0 mg GSL/kg zemlje, predvsem sinigrina, s Sa smo v tla vnesli 23,5 mg GSL/kg zemlje, predvsem glukoalizina, z Es smo v tla vnesli 8,3 mg GSL/kg zemlje, predvsem GSL7 (neidentificirani GSL). Sa je imela izrazito manj GSL kot ostali dve biocidni rastlini. Tudi delež posameznih GSL je bil povsem drugačen.

V prvem lončnem poskusu, brez dodanega mikoriznega inokuluma, se F% pri biocidnih rastlinah statistično ni razlikovala od K in SOL. Ob dodajanju mikoriznega inokuluma se razmerja pri biocidnih rastlinah bistveno niso spremenila. V drugem lončnem poskusu, se je F% med biocidnimi rastlinami razlikovala. Na znižanje F% v primerjavi s kontrolo so vplivale Bj in Sa, Es pa ne. Ob dodajanju MI negativnega vpliva biocidnih rastlin na mikorizo ni bilo. Mikorizna kolonizacija je bila podobna kot pri kontroli. V poljskem poskusu so rastline za zeleni podor (bob) in biocidne rastline minimalno vplivale na F%. V primerjavi s kontrolo je bila F% manjša v obravnavanju Vf za 12,7 %, v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami pa od 1,1 do 6 %. Najnižjo F% je imelo obravnavanje Vf, ki se je edino statistično razlikovalo od mikorizno najbolj koloniziranih rastlin pod črno folijo (SOL ČF 6).

Iz primerjav med vplivom delovanja biocidnih rastlin in kontrolo (brez dodajanja MI) lahko razberemo majhen negativen vpliv biocidnih rastlin na mikorizno kolonizacijo (poljski poskus, lončni poskus II) ali celo ugoden vpliv biocidnih rastlin na mikorizno kolonizacijo (lončni poskus I in III), s čimer smo potrdili našo hipotezo. Vpliv GSL na AM je bil lahko minimalen ali celo ugoden zaradi zastopanosti posameznih GSL v rastlinah (Pongrac in sod., 2008). Spremljanje vpliva biocidnih rastlin Sa in Es na mikorizno kolonizacijo jagod smo prvič preizkusili v naših poskusih. Vpliv Bj je bil v poskusih že raziskan (Branzanti in sod., 2002). Zaradi možnosti strupenega delovanja GSL smo v naših poskusih in nadalje v praksi zamaknili čas sajenja jagod po biofumigacij na najmanj dva do tri tedne po zaoravanju biocidnih rastlin. Delovanje GSL na F% in DSE se bistveno ni spremenilo tudi ob inokulaciji z AM.

Razmerja pri ostalih parametrih mikoriznosti jagod (M%, m%, A%, a%) so bila približno enaka kot pri F%. Dosežene vrednosti navedenih parametrov so bile v našem poskusu, v

primerjavi z doseženimi vrednostmi Branzantijeve in sod. (2002), mnogo nižje. V času cvetenja je bila A% v njihovih poskusih največja (25 %), M% pa okrog 42 %. V obdobju obiranja je bila M% najvišja, 64 %, medtem ko se je A% zmanjšala na 20 %. V naših poljskih poskusih M% ni presegla 5,5 % in A% 1,3 %, v lončnih poskusih pa M% ni presegla 24,4 % in A% ni presegla 12,9 %. Jagode kažejo izrazito sezonsko nihanje v mikorizni kolonizaciji, neodvisno od tehnologije pridelovanja. Izjema je bila pri kemičnem razkuževanju. Po obiranju začnejo vrednosti A% in M% upadati, kar lahko pomeni, da mikoriza izgublja na pomenu pri prehrani rastlin. Vrednosti A% in M% so bile v našem poskusu tako majhne zato, ker so bili vzorci korenin odvzeti zelo zgodaj po sajenju. Branzantijeva in sod. (2002) so parametre mikoriznosti spremljali pri ekološki pridelavi, zmanjšanjem gnojenju, zelenem gnojenju z ječmenom, zelenem gnojenju z Bj, kemičnem razkuževanju z MB in kontroli. Ugotovili so, da je bila M% pri ekološki pridelavi in kontroli nekoliko nad 25 %, pri zmanjšanjem gnojenju približno 6 %, pri zelenem gnojenju z ječmenom približno 14 % in pri dodajanju Bj približno 8 %. Ugotovili so izrazito majhen vpliv biocidnih rastlin na F%, nekoliko izrazitejši vpliv na M% in m% ter A% in a%, kar je nedvomno odvisno od časa odvzema vzorca. M% in A% se povečujeta s trajanjem mikorizne kolonizacije.

Arcuti in sod. (2001) so ugotovili, da se učinek delovanja GSL poveča v kombinaciji s solarizacijo. Delovanje biocidnih rastlin grbasta repnica (*Rapistrum rugosum*), konjski bob (*Vicia faba* var. *minor*) in MB v primerjavi s kontrolo v kombinaciji s solarizacijo in brez solarizacije je imelo na rast in rodnost jagod (masa pridelka, število plodov) velik vpliv. Razlike v povprečnem pridelku med obravnavanji s solarizacijo in obravnavanji brez solarizacije so bile izrazite. Pridetek jagod je bil največji pri obravnavanjih z MB. Statistično se je pridelek razlikoval od ostalih obravnavanj. Najmanjši je bil pri podoru z bobom. Spremljali so tudi vpliv obravnavanj na škodljivo glivo *Pythium* sp. Najizrazitejše je bilo delovanje biocidne rastline grbasta repnica in nato MB. Učinek boba na škodljivo glivo je bil enak kot pri kontroli. Skupna mikroflora je bila največja v obravnavanju z grbasto repnico. Na podlagi dejstva, da škodljivih gliv v obravnavanjih z grbasto repnico ni bilo, obenem pa, da je bil delež skupne mikroflora prav v obravnavanju z grbasto repnico največji, lahko velik pridelek pripišemo skupnemu delovanju povečane organske snovi in biocidnega delovanja rastlin.

#### **6.4.2 Vpliv solarizacije na mikorizno kolonizacijo**

V slovenskih klimatskih razmerah je s solarizacijo težko doseči potrebno količino visokih temperatur v tleh, zato je kombinacija biofumigacije in solarizacije zelo perspektiven tehnološki ukrep. Daugovish in sod. (2003) so primerjali vpliv rastlin Bj, Sa, Vf in mešanice rži (*Secale cereale*) in tritikale (*Triticum aestivum* x *Secale cereale*) na sklerocije škodljive glive *Sclerotinia minor*, ogorčice (*Tylenchulus semipenetrans*) in na kalitev plevelnih rastlin mnogolična meteljka (*Medicago polymorpha*), mnogocvetna ljujka (*Lolium multiflorum*) in srhkodlakavi ščir (*Amaranthus retroflexus*). Polovico poskusnih parcel so po mulčenju pokrili s PVC folijo. Populacija ogorčic se je v primerjavi z mešanico detelj in žit pri biofumigaciji z Bj in Sa zmanjšala za 92 %. Biofumigacija na sklerocije škodljivih gliv ni vplivala, medtem ko se je pri kombinaciji Bj in solarizacije zmanjšala prisotnost sklerocijev škodljivih gliv za 75 %. Na poskusnih parcelah je bila kljub biofumigaciji še vedno močno zastopana gliva z biocidnim potencialom

(*Trichoderma* sp.). Rezultati se ujemajo z rezultati Smitha (2001), ki je ugotovil, da se gliva *Trichoderma* sp. ob prisotnosti ITC normalno razvija, medtem ko so že ob nizkih koncentracijah ITC glive *Gaemannomyces graminis*, *Pythium sulcatum* in bakterija *Ralstonia solonacearum* propadle. Vpliv Sa in folije se je izrazil tudi v večjem pridelku. Smith je ugotovil, da biofumigacija ne deluje na vse MO, ampak prizadene samo določene.

V našem poljskem poskusu smo dokazali ugoden oz. nevtralen učinek solarizacije na razvoj mikorizne glive. V poskusu s črno in prozorno folijo z različnim trajanjem prekrivanja smo dosegli različne učinke. Pod prozorno folijo je bila dosežena višja temperatura tal in globlje ogrevanje. Za razliko od naših poskusov, Rieger in sod. (2001) niso dobili bistveno drugačnih temperatur tal pod prozorno in črno folijo. Tudi razlike v temperaturi tal pod enojnimi in dvojnimi folijami so bile minimalne. Razlike med učinki folij se z globino manjšajo in so bile na 25 cm praktično izenačene. V našem poljskem poskusu smo pod prozorno folijo na globini 10 cm presegli kritično temperaturo 37 °C v 6 dneh (170 ur). Povprečna maksimalna temperatura na globini 10 cm je bila 39,8 °C, na globini 20 cm pa 36,6 °C. Pod črno folijo je bila povprečna maksimalna temperatura na globini 10 cm 36,7 °C, za 3,1 °C nižja kot pod prozorno folijo. Na globini 20 cm je bila temperatura 33,4 °C. Temperatura tal na globini 20 cm je bila pri kontroli le 24,9 °C, več kot 12 °C nižja kot pod prozorno folijo. Trajanje visokih temperatur je bilo ob vseh načinih prekrivanja prekratko. V mediteranskih območjih, kjer solarizacijo že vključujejo v proces priprave tal, dosegajo bistveno višje temperature in dolga obdobja trajanja visokih temperatur tudi na večjih globinah (Razik, 1989; Baruzzi in sod., 1997; Chase in sod., 1999; Palumbo s sod., 1999; Prinzevalli in sod., 2001; Rosati, 2002; Su in sod., 2007).

Prozorna folija je v poljskem poskusu nedvomno vplivala na manjše število plevelov, ni pa imela, v primerjavi z ostalimi alternativnimi metodami in kontrolo, vpliva na mikorizno kolonizacijo ali pridelok. Črna folija je v poljskem poskusu vzpodbudila večjo mikorizno kolonizacijo. Glede na to, da se v Sloveniji število dni s temperaturami nad 30 °C v začetku poletja, ko solarizacija poteka, vse bolj povečuje, bomo lahko ta ukrep vse bolj učinkovito izkoriščali. Ukrep solarizacije je učinkovit predvsem na lažjih peščenih tleh, ki se bolj ogrejejo kot težka tla, ki prevladujejo v naših rastnih razmerah. Učinek solarizacije je v Sloveniji lahko manjši tudi zaradi številnih oblačnih in deževnih dni, ki se pogosto pojavijo v začetku junija, to je v obdobju, ko naj bi začeli s postopkom solarizacije zemlje za jagode.

Vpliv solarizacije na mikorizno kolonizacijo v poljskem poskusu in segrevanje substrata v lončnih poskusih je bilo primerljivo z vplivom delovanja biocidnih rastlin, kar potrjuje našo hipotezo. Solarizacija s črno in prozorno folijo ter trajanje solarizacije so različno vplivali na F%. Razlike med obravnavanji solarizacije v poljskem poskusu in ostalimi obravnavanji so bile prisotne, vendar niso bile statistično značilne. Vpliv prozorne folije na segrevanje tal ter s tem neposredno na zmanjšanje F% je bil mnogo večji kot vpliv črne folije, kjer so bile temperature tal izrazito nižje. Trajanje prekrivanja je imelo na mikorizo velik vpliv, saj je bila F% v obravnavanju, kjer je bila zemlja za tri tedne dalj prekrita s prozorno folijo, manjša za 5,4 %, pri črni foliji pa za 2,9 %. Solarizacija vpliva na zmanjšanje populacije ne samo škodljivih gliv, temveč tudi mikoriznih. V primerjavi s kontrolo se je število spor na gram solarizirane zemlje v poskusih Mishra in sod. (2002) zmanjšalo za eno tretjino, kar se je neposredno odražalo tudi na manjšem pridelku.



Schreiner in sod. (2002) so dobili drugačne podatke. Temperatura tal na globini od 5 do 20 cm se je dvignila za 8 do 10 °C, vendar ni vplivala na zmanjšanje AM. V veliki meri pa je vplivala na zmanjšanje števila plevelnih rastlin.

Pomemben je tudi podatek, da je bila mikoriznost korenin pod črno folijo največja, vendar ne statistično značilna v primerjavi z vsemi ostalimi obravnavanji in kontrolo. Uporaba črne folije je standard v praktično vseh tehnologijah pridelave jagod. Zanimiv je tudi podatek, da je bilo največ DSE oz. nepoznanih endofitnih gliv pod prozorno folijo. Negativen vpliv segrevanja substrata na 37 °C je bil na mikorizne glive zelo majhen. V prvem lončnem poskusu je bila F% skoraj 90 %, v drugem pa nad 50 %. Pri kontroli je bila F% v obeh lončnih poskusih nekaj nad 80 %. Ob dodatku mikoriznega inokuluma so se vrednosti mikorizne kolonizacije v skoraj vseh obravnavanjih približale kontroli. Vrednost F% in ostalih parametrov se pri kontroli niso spremenile, če smo zemlji dodali MI. Scagel (2003) trdi, da inokulacija z mikoriznimi inokuli značilno poveča kolonizacijo z mikoriznimi glivami tako v razkuženih (para) kot nerazkuženih tleh.

### **6.4.3 Vpliv dazometa na mikorizno kolonizacijo**

Kemično razkuževanje tal uniči mikorizne glive oz. zavira njihov razvoj (McGraw in Hendrix, 1986; Branzanti in sod., 2002). Ponovna reinfekcija se vzpostavi po približno pol leta. Prisotnost posameznih vrst v tleh je močno odvisna od letnega časa. Na kemično razkuževanje so mikorizne glive različno občutljive. Učinek kemičnega razkuževanja z dazometom je bil v našem poljskem poskusu majhen. Frekvenca mikorize jagod v obravnavanju z dazometom je bila v primerjavi s kontrolo manjša samo za 1 %. Razlog za majhen vpliv dazometa na mikorizne glive v poljskem poskusu so bili lahko zunanji dejavniki in velika remikorizacija tal (Niemi in Vestberg, 1992). V lončnih poskusih je dazomet skoraj popolnoma uničil mikorizne glive. Razlog za tako izrazito delovanje dazometa bi lahko bil tudi v slabem zračenju substrata po zaključku razkuževanja ali prevelika koncentracija sredstva (Harris, 1991). V obravnavanjih, kjer smo v lončnih poskusih z dazometom razkuženemu substratu dodali MI, so bile rastline normalno kolonizirane, pridelek in rast pa sta se bistveno povečala v primerjavi z obravnavanji brez MI. Frekvenca mikorize se ni razlikovala od kontrole. V našem poskusu so bili parametri mikoriznosti po inokulaciji enaki parametrom naravno inokuliranih rastlin v poskusih, ki so jih izvajali Baruzzi in sod. (2000).

### **6.5 DSE in nepoznani koreninski endofiti ter alternativne metode razkuževanja tal**

Jagode najpogosteje odmrjejo zaradi bolezni koreninskega sistema, ki so povezane s težkimi, izčrpanimi in okuženimi tlemi ter občutljivostjo sorte. S kemičnim razkuževanjem uničimo praktično vse MO, zato v kemično razkuženih tleh redko zaznamo odmiranje rastlin. V primerjavi s kontrolo, kjer odmre nad 10 % rastlin, v solariziranih nasadih odmre približno 5 % rastlin (Baruzzi in sod., 1997). Ugotovitve pa so lahko tudi nasprotno, da več rastlin odmre v kemično razkuženih tleh (Chandler in sod., 2001). Rezultati posameznih poskusov so lahko tako različni tudi zato, ker z razkuževanjem tal z MB zatremo glive iz kompleksa, ki povzročajo črno koreninsko gnilobo. Ponovna okužba s hitro rastočimi glivami kot sta *Pythium* sp. ali *Rhizoctonia* sp. je zelo velika, kar zmanjšuje

učinek MB in verjetno tudi drugih kemičnih sredstev za razkuževanje tal (Katan, 1981). Pri boleznih koreninskega sistema ima pomembno vlogo občutljivost sorte. Okužbe tolerantnih sort s škodljivo glivo ne vplivajo na zmanjšanje koreninskega sistema in listne površine. Vpliv škodljivih gliv se izrazi le na občutljivih sortah (Branzanti in sod., 1998).

Ob spremljanju mikoriznih gliv smo v naših poskusih (na posameznih vzorcih korenin) zasledili mikrosklerocije, ki niso pripadali mikoriznim ali škodljivim glivam in na rast rastlin niso imele negativnega vpliva. Obravnavali smo jih kot DSE glive ali nepoznane koreninske endofite, ki so težko določljivi in malo poznani. Njihova vloga v naravi je neraziskana. V naših poskusih smo se osredotočili na neškodljive koreninske endofite zato, ker so škodljive glive v odnosu do alternativnih metod razkuževanja tal tema številnih raziskav. Ob kontroli mikoriznosti smo le v enem izmed naših vzorcev zasledili konidije glive, ki so bile podobni škodljivi glivi *Alternaria alternata*, opisani v raziskavi Cavannija in sod. (1996).

Delež rastlin z DSE, škodljivimi ali nepoznanimi koreninskimi endofiti je bil v poljskem poskusu zelo majhen. V lončnih poskusih je bil delež rastlin z različnimi mikrosklerociji nemikoriznih gliv večji. V obravnavanjih brez mikoriznega inokuluma je bilo mikrosklerocijev manj kot v obravnavanjih z dodanim mikoriznim inokulumom. Glede na to, da se preživetvene strukture (sklerociji) pojavijo ob stresu, lahko predvidevamo, da inokulacija rastlin z mikoriznim inokulumom predstavlja določen stres. Med nemikoriznimi glivami so v lončnih poskusih prevladovali mikrosklerociji Tipa 4 in Tipa 1, ki jih z molekulskimi metodami nismo uspeli določiti. V poljskem poskusu je bilo največ rastlin z nemikoriznimi mikrosklerociji v obravnavanju s kemičnim razkuževanjem in pod prozorno folijo. V lončnih poskusih je bilo v LP I in LP II izrazito več nemikoriznih mikrosklerocijev v obravnavanjih, ki jim je bil dodan MI in to v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami. Razlog za večjo pojavnost teh organizmov smo iskali v mikoriznem inokulumu. S pomočjo molekulskih metod nam ni uspelo določiti nobene od navedenih nemikoriznih gliv.

## **6.6 Molekulska identifikacija AM, DSE in koreninskih endofitov**

Prisotnost AM, DSE in škodljivih gliv ter ostalih koreninskih endofitov je bila dokazana z meritvami mikoriznosti vzorcev korenin in spremljanjem posameznih mikrosklerocijev neznanega izvora, ki smo jih obravnavali kot DSE, škodljive ali nepoznane koreninske endofite. Z metodo PCR in TTGE smo v vzorcih iz drugega in tretjega lončnega poskusa delno identificirali vrste mikoriznih in ostalih endofitnih gliv. DNA smo izolirali in pomnoževali s specifičnimi začetnimi oligonukleotodi za glive. Z molekulsko identifikacijo gliv v koreninah jagod smo želeli poenostaviti dokazovanje mikoriznih gliv, ki je prej temeljilo na osnovi spor in škodljivih gliv, ki je temeljilo na določanju na osnovi gojenja na gojiščih. Vzorce smo odbrali na osnovi rezultatov pregleda mikorizne kolonizacije. S prvim TTGE smo dokazali samo prisotnost gliv iz rodu *Glomus* spp. ter prisotnost škodljive glive *Rhizoctonia* sp. Z drugim TTGE nam je uspelo senkvenciranje dveh nepoznanih gliv, *Microdiplodia* sp. in ene mikorizne glive (*Glomus intraradices*). Število fragmentov je bilo povsod približno enako, ne glede na obravnavanje.

Na podlagi rezultatov TTGE metode smo iz drugega lončnega poskusa med vzorci iz kontrole (K 2, K 10 in K13) in vzorci iz obravnavanja, kjer je bila rastnemu substratu dodana biocidna rastlina Es, ugotovili veliko razliko med pogostostjo posameznih fragmentov DNA. Število gliv v kontrolnih vzorcih je bila mnogo večje od števila gliv iz obravnavanja z biocidno rastlino Es. Biocidne rastline niso vplivale le na stopnjo kolonizacije (podatki mikoriznosti pri Es) temveč tudi na raznovrstnost (diverziteto) AM gliv.

## 6.7 Sklepi

Pomen raziskovanja alternativnih metod razkuževanja tal ni le v preizkušanju tehnologij za neposredno uporabo v kmetijski pridelavi, temveč v spoznavanju vplivov posameznih ukrepov na okolje, predvsem na življenje v tleh. V rastlinski pridelavi se vse pogosteje srečujemo s pomanjkanjem zemljišč. Vse več je nerodovitnih tal, ki jih ovrednotimo kot utrujena, izčrpana, degradirana, zasoljena, zasičena, mrtva in dr. Z intenzivnim kmetovanjem v tleh ustvarjamo neravnovesje v založenosti s hranili in v zasičenosti s škodljivimi organizmi, kar dolgoročno vodi v vse manjši in manj kakovosten pridelek. Alternativne metode razkuževanja tal so namenjene ustvarjanju ugodnih pogojev za rast gojenih rastlin, obenem pa ohranjanju oziroma vzpodbujanju sožitja med kmetijskimi rastlinami in mikroorganizmi v tleh. Biofumigacija in solarizacija sta zaradi izrazito trajnostne naravnosti vse bolj raziskovana tehnološka ukrepa (Gianinazzi in sod., 2010). Na osnovi rezultatov naših poskusov, ki smo jih postavili na podlagi postavljenih hipotez, smo prišli do sledečih sklepov:

- V naši raziskavi, ki je temeljila na lončnih in poljskem poskusu smo ugotovili, da sta imeli biofumigacija in solarizacija na parametre rasti, rodnosti in zdravstvenega stanja jagod nevtralen ali pozitiven vpliv. Učinki so bili rezultat delovanja več dejavnikov. Pri biofumigaciji smo z biocidnimi rastlinami v tla vnesli glukozinolate, ki so predvidoma zmanjšali populacijo škodljivih organizmov, obenem pa smo z vnosom velike količine organske snovi vplivali na ugoden razvoj mikorize in s tem na povečano kolonizacijo korenin z AM v primerjavi s kemičnim razkuževanjem (lončni poskusi). S solarizacijo smo vplivali na MO in sočasno na povečano mineralizacijo. Učinkovitost biofumigacije in solarizacije je bila v poljskem poskusu primerljiva z delovanjem kemičnega razkuževanja z dazometom. V lončnih poskusih je bilo delovanje obeh alternativnih metod na parametre rasti in rodnosti bolj ugodno kot kemično razkuževanje.
- Z biocidnimi rastlinami smo v lončnih poskusih v substrat vnesli velike količine organske snovi, zato se je povečala količina P in K. S povečanjem količine P se je v drugem lončnem poskusu sorazmerno zmanjšala frekvenca AM jagod.
- V poljski poskus je bila vključena tudi nebiocidna rastlina drobnoplodni krmni bob, ki je imela največjo listno maso. Posebne učinke na pridelek in na MO v tleh rastlina ni imela.
- Na zatiranje plevelov je bila v poljskem poskusu, v primerjavi s kontrolo, delno učinkovita le solarizacija s prozorno folijo. V primerjavi s kontrolo, se je

zapleveljenost v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami povečala. Razlog je bil verjetno v vnosu organske snovi v zgornjo plast zemlje, ki je vplivala na boljše kaljenje plevelnih rastlin. V lončnih poskusih je rast plevelov zavirala bela gorjušica (Sa).

- Z zaoravanjem različnih biocidnih rastlin smo v tla vnesli različne vrste in količine GSL, ki na kolonizacijo korenin jagod z AM niso delovale negativno. To smo potrdili z ocenjevanjem kolonizacije po Trouvelotu. Občutljivost na posamezne vrste AM na GSL smo potrdili z molekulske tehniko TTGE. Ugotovili smo, da je bilo v vzorcih kontrolnih rastlin prisotnih več vrst AM gliv kot v vzorcih iz obravnavanja z biocidno rastlino navadna rukvica (Es).
- Solarizacija na mikorizno kolonizacijo v primerjavi s kontrolo ni imela vpliva. To potrjuje dejstvo, da mikorizne glive dobro prenašajo visoke temperature.
- Vpliv folij na pridelek v poljskem poskusu je bil enak vplivu dazometa in se ni razlikoval od kontrole.
- Dodajanje naravnega mikoriznega inokuluma v dveh lončnih poskusih je vplivalo na povečano mikorizno kolonizacijo jagod (F%). V prvem lončnem poskusu razlike niso bile statistično značilne, v drugem pa so bile v vseh obravnavanjih, razen Es in kontroli. Na izenačenost dodanih mikoriznih inokulumov v prvem in drugem poskusu lahko sklepamo iz primerjav parametrov mikoriznosti v kontroli, ki so bili v prvem in drugem lončnem poskusu skoraj enaki.
- Hipoteza, da kemično razkuževanje skoraj popolnoma uniči AM je bila zanesljivo potrjena v lončnih poskusih. V poljskem poskusu rezultati niso bili prepričljivi, saj je bila F% pri razkuževanju z dazometom večja kot v kontrolnih obravnavanjih, kar je bilo verjetno posledica hitre remikorizacije tal.
- Delež rastlin z DSE, škodljivimi ali nepoznanimi koreninskimi endofiti je bil v poljskem poskusu majhen, v lončnih poskusih pa nekoliko večji. V obravnavanjih z dodanim MI je bilo mikrosklerocijev več kot v obravnavanjih brez MI. Glede na to, da se preživetvene strukture (sklerociji) pojavijo ob stresu, lahko predvidevamo, da inokulacija rastlin z MI predstavlja določen stres.
- Mikroskopsko spremljanje mikoriznosti je dolgotrajno in zahtevno, vendar izraža dejansko stanje MO v tleh. Molekulske metode PCR in TTGE so hitre, vendar ustreznih povezav med laboratorijskimi rezultati in rezultati v naravi še ni.
- Na podlagi lončnih poskusov smo ugotovili, da je za doseganje večjih učinkov biofumigacije in solarizacije v tleh (naravno okolje) potrebno povečati maso zaoranih rastlin (sorta, čas setve, gnojenje, varstvo, čas zaoravanja) ter pri solarizaciji podaljšati rok prekrivanja s prozorno folijo.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

Intenzivna pridelava jagod (*Fragaria x ananassa* Duch.) vključuje tehnološke ukrepe priprave tal in varstva rastlin, ki bi se morali ob vse večji skrbi za okolje in zdravje ljudi ter ob vse večjem prehajanju na ekološko pridelavo spremeniti. Fizikalne, kemične in biološke lastnosti tal neposredno vplivajo na kakovost in količino pridelka jagod. V vseh tehnologijah pri napravi nasadov dajemo velik poudarek izbiri lege, lokaciji ter pripravi tal, pri kateri je pomembno upoštevanje večletnega kolobarja in poznavanje rastlin, primernih za kolobarjenje. S tem se izognemo enostranskemu izčrpavanju hranil iz tal, predvsem pa škodljivim talnim glivam, ki predstavljajo enega izmed najtežje rešljivih problemov v pridelavi jagod. Pri zelo visoko intenzivnih tehnologijah vlogo kolobarja nadomesti kemično razkuževanje, ki je zdravju ljudi škodljivo in okolju neprijazno. V trajnostno kmetijsko pridelavo se uvajajo alternativne oblike razkuževanja tal, med katerimi sta najbolj razširjeni biofumigacija in solarizacija, s katerima želimo večletni kolobar v pridelavi jagod skrajšati na eno do dve leti. Vse metode razkuževanj posegajo v življenje škodljivih in koristnih MO, med katerimi so tudi AM glive. Vpliva alternativnih metod na koreninske endofite in posreden vpliv na pridelek sta odvisna od tipa razkuževanja, rastnih in klimatskih razmer ter gojene kulture. Spremljanje vpliva razkuževanja tal na koreninske endofite je s konvencionalnimi metodami (ocenjevanje kolonizacije po Trouvelotu) dolgotrajno, zato smo v analizo sprememb v tleh vključili tudi molekulske metode (PCR in TTGE), s katerimi smo ovrednotili vpliv metod razkuževanja tal na koreninske edofite in delno določili raznolikost gliv.

Posledice biofumigacije in solarizacije na razvoj rastlin, AM in DSE gliv smo tri leta spremljali v lončnih poskusih v zavarovanem okolju in eno leto v poljskem poskusu na prostem. Vpliv alternativnih metod razkuževanja smo spremljali v primerjavi s kemičnim razkuževanjem z dazometom in kontrolo. V lončnih poskusih smo solarizacijo izvedli z ogrevanjem zemlje na 37 °C, biofumigacijo pa z dodajanjem zmletih biocidnih rastlin Bj, Sa in Es. V lončnih poskusih smo polovico rastlin vsakega obravnavanja inokulirali z naravnim mikoriznim inokulumom, gojenim na koreninah koruze, posejane v zemljo iz ekološkega nasada jagod. V poljskem poskusu smo solarizacijo izvedli s črno in prozorno folijo, s katerima smo poskusne parcele prekrili za 6 in 9 tednov. Biofumigacijo smo v poljskem poskusu izvedli z zelenim gnojenjem z biocidnimi rastlinami iz družine križnic Bj, Sa in Es v primerjavi z zelenim gnojenjem z Vf.

Alternativne metode razkuževanja tal, predvsem biofumigacija, spremenijo razmere v tleh. S kemično analizo zemlje pred izvedbo lončnega poskusa in po zaključku poskusa smo dokazali nevtralen ali ugoden vpliv zelenega gnojenja z biocidnimi rastlinami ter solarizacije na rast jagod in razvoj koristnih AM gliv. Solarizacija in biofumigacija sta s povečanjem organske snovi in hranil v tleh ter vzpostavitev ugodnih razmer za razvoj koristnih talnih MO pripomogli k večji kakovosti tal. Križnice pomembno vplivajo na založenost tal z dušikom za sledečo kulturo (Smith in sod., 2004; Marchetti in sod., 2008). Kljub temu, da smo v poljskem poskusu s Sa v tla vnesli najmanj organske snovi, je na pridelek najugodnejše delovala. Vpliv Sa na pridelek je bil najbolj ugoden tudi v lončnih poskusih.

V poljskem poskusu smo v tla z biocidnimi rastlinami zaorali različne količine organske snovi in s tem različne količine GSL. V lončne poskuse smo vnesli vedno enako količino organske snovi biocidnih rastlin.

Poleg bolezni predstavljajo v jagodah največji problem pleveli. Zatiranje s herbicidi je zaradi nujne selektivnosti pripravkov težko in drago. V IP in EKO pridelavi neposredna uporaba herbicidov ni dovoljena. Sajenje jagod na folijo omeji zapleveljenost na velikem delu nasada, vendar je zapleveljenost sadilnih mest še vedno zelo velik problem. Večina kemičnih sredstev za razkuževanje tal deluje tudi herbicidno. Novejša kemična sredstva so v primerjavi z MB bolj selektivna in manj učinkovita. V našem poljskem in lončnih poskusih je bil dazomet, v primerjavi z alternativnimi metodami, pri zatiranju plevelnih rastlin učinkovit. Kolobarjenje z rastlinami za zeleno gnojenje ima izrazit vpliv na fizikalne lastnosti tal in povečano zapleveljenost (Lazzeri in Manichi, 2001). V poljskem poskusu so bila obravnavanja z biocidnimi rastlinami bolj zapleveljena. Število plevelov se je v vseh obravnavanjih z rastlinami za podor, vključno z biocidnimi, zelo povečalo. Največja zapleveljenost je bila v obravnavanju Vf, najmanjša pa pri Sa. Iz vseh štirih poskusov lahko povzamemo, da je rast plevelov preprečevala le Sa, s čimer lahko le delno potrdimo hipotezo, da biofumigacija zmanjšuje zapleveljenost. Učinek solarizacije s prozorno folijo na zapleveljenost je bil v poljskem poskusu od alternativnih metod največji. Statistično se ni razlikoval od obravnavanja, kjer smo tla kemično razkuževali z dazometom. V lončnih poskusih je od alternativnih metod na zapleveljenost imelo največji vpliv obravnavanje Sa, katerega učinek se statistično ni razlikoval od obravnavanja D.

Mikorizna kolonizacija jagod je odvisna od zunanjih, genetskih in tehnoloških dejavnikov (Branzanti in sod., 2002; Duncan, 2002; Vestberg in sod., 2002). Z vnosom velikih količin organske snovi se v tleh poleg hranil poveča tudi število MO. Povprečna mikorizna kolonizacija je bila v poljskem poskusu nižja kot v lončnih poskusih. Temeljni razlog za razliko v mikorizni kolonizaciji je bil v razliki med naravnim okoljem in zavarovanim okoljem rastlinjaka. V vzorcih iz vseh poskusov smo opazili predvsem arbuskule in hife, le redko vezikle, nikoli pa svitkov. Prisotni so bili tudi drugi mikrosklerociji, ki smo jih obravnavali kot DSE ali nepoznane koreninske endofite. Razlog za majhno zastopanost veziklov je bil v tem, da vezikli predstavljajo založno strukturo, ki se razvije po daljši uspešni povezavi glive in rastline. Frekvenca mikorize jagod je bila v naših poskusih zelo velika, z izjemo v obravnavanju, v katerem smo uporabili dazomet. V poljskem poskusu je bila od 37 % do 55,5 %, v LP I in LP II brez dodanega MI pa od 47,3 % do 96 %. V obravnavanjih z dodanim MI je bila frekvenca mikorize večja. Jagode so se na inokulacijo z AM v različnih obravnavanjih različno odzivale. Nekatere so z inokulacijo pridobile, druge izgubile (Stewart in sod., 2005). Z biofumigacijo nekateri koristni MO (aerobne bakterije, koristne prostoživeče ogorčice, *Pseudomonas* spp. in aktinomicete) pridobijo, drugi pa izgubijo (Scott in Kundsén, 1999; Riga, 2007; Mattner in sod., 2008). Strupenosti biocidnih rastlin na sledečo kulturo se izognemo s sejanjem ali sajenjem glavne kulture vsaj nekaj tednov po zaoravanju biocidnih rastlin (Scott in Kundsén, 1999). Iz podatkov vpliva biocidnih rastlin na mikorizno kolonizacijo v kontroli (brez dodajanja MI) lahko razberemo zelo majhen negativen vpliv (poljski poskus, LP II) ali celo ugoden vpliv biocidnih rastlin na mikorizno kolonizacijo (LP I in LP III). Podatki pri ostalih parametrih mikoriznosti jagod (M%, m%, A%, a%) so bili podobni F%. Dosežene vrednosti ostalih

parametrov, so bile v našem poskusu nizke, podobno kot v poskusu Branzanti in sod. (2002).

V slovenskih klimatskih razmerah s solarizacijo težko dosežemo potrebno količino visokih temperatur, zato je kombinacija biofumigacije in solarizacije zelo perspektiven tehnološki ukrep. V poljskem poskusu smo dokazali nevtralen učinek solarizacije na mikorizne glive. Pod prozorno folijo je bila dosežena višja temperatura tal in globlje ogrevanje kot pod črno folijo. V poljskem poskusu smo pod prozorno folijo na globini 10 cm presegli kritično temperaturo 37 °C v 6 dneh (170 ur). Trajanje visokih temperatur je bilo v vseh načinih prekrivanja tal prekratko. Prozorna folija je v poljskem poskusu nedvomno vplivala na manjše število plevelov, ni pa imela, v primerjavi z ostalimi alternativnimi metodami in kontrolo, vpliva na mikorizno kolonizacijo ali pridelek. Največ DSE oz. nepoznanih koreninskih endofitov je bilo pod prozorno folijo. Mikoriza je bila, tudi v primerjavi z vsemi ostalimi obravnavanji in kontrolo, najbolj razvita pod črno folijo.

Kemično razkuževanje tal uniči mikorizne glive oz. zavira njihov razvoj (McGraw in Hendrix, 1986; Branzanti in sod., 2002). Prisotnost posameznih vrst MO v tleh je močno odvisna od letnega časa. Na kemično razkuževanje so AM glive različno občutljive. Učinek kemičnega razkuževanja z dazometom v poljskem poskusu je bil majhen. Frekvenca mikorize jagod v obravnavanju z dazometom je bila v primerjavi s kontrolo manjša samo za 1%. Razlogi za majhen vpliv dazometa na mikorizne glive v poljskem poskusu so bili lahko zunanji dejavniki in velika moč remikorizacije tal (Niemi in Vestberg, 1992). V lončnih poskusih je dazomet skoraj popolnoma uničil mikorizne glive.

Z AM kolonizirane rastline so bolj učinkovite v pridobivanju hranil in vode, manj občutljive na bolezni ter bolj produktivne v danih rastnih razmerah kot nemikorizne rastline, vendar med pridelkom in mikorizno kolonizacijo ni jasnih povezav (Smith in Read, 1997; Vestberg in sod., 2002). Dodajanje MI sicer vpliva na višjo stopnjo kolonizacije, ki pa se nujno ne izrazi v višjem pridelku (Regvar in sod., 2003; Gosling in sod., 2006). V večini poskusov, kjer so preučevali vpliv mikoriznih gliv na rast in rodnost jagod, je bil vpliv mikoriznih gliv na rastline pozitiven. Inokulirane rastline imajo večjo maso korenin in poganjkov, večje plodove in večji pridelek (Paraskevopoulou-Paroussi in sod., 1997; Matsubara in sod., 2004; Sharma in Adholeya, 2004). Učinek mikoriznih gliv na rast in razvoj jagod pa je lahko tudi negativen (Taylor in Harrier, 2001; Stewart in sod., 2005). Iz rezultatov poljskega poskusa ne moremo trditi, da sta bili intenziteta rasti in količina pridelka odvisni oz. povezani s frekvenco mikorize ali intenziteto mikorizne kolonizacije. V lončnih poskusih smo medsebojni vpliv F% in rasti (masa listov) lahko potrdili le v LP III, medsebojni vpliv rodnosti ter F% in M% pa v LP I in LP III. AM so obligatni biotrofi, kar pomeni, da so odvisni od svojega gostitelja. Običajno so koristni za rastlino, vendar lahko rast rastlin tudi zmanjšajo in postanejo pod določenimi pogoji paraziti, predvsem v zgodnji fazi kolonizacije (Schönbeck, 1979). V poljskem poskusu smo v obravnavanjih s solarizacijo s črno ali prozorno folijo, ne glede na trajanje prekrivanja, dosegli najmanjši pridelek. Kljub dejstvu, da je bila kolonizacija korenin z mikoriznimi glivami v obravnavanjih s črno folijo največja (ne statistično značilno), je bil pridelek prav v teh dveh obravnavanjih najmanjši.

Ob spremljanju mikoriznih gliv, smo na posameznih vzorcih korenin zasledili mikrosklerocije, ki niso pripadali mikoriznim ali škodljivim glivam. Obravnavali smo jih kot DSE ali nepoznane koreninske endofite. DSE, katerih vloga je v naravi slabo poznana, so težko določljive in malo poznane. V lončnih poskusih je bil delež rastlin z nepoznanimi mikrosklerociji večji, v poljskem poskusu pa zelo majhen. Med mikrosklerociji so v lončnih poskusih prevladovali Tip 4 in Tip 1. Gliv z molekulskimi metodami nismo uspeli določiti. V poljskem poskusu je bilo največ rastlin z nepoznanimi mikrosklerociji v obravnavanju s kemičnim razkuževanjem in pod prozorno folijo, v lončnih poskusih pa v obravnavanjih Es, kar nakazuje na to, da se DSE razvijejo v stresnih razmerah.

Prisotnost mikoriznih, DSE, škodljivih in nepoznanih koreninskih endofitov je bila ovrednotena ob mikroskopiranju vzorcev korenin. Z molekulskimi metodami PCR in TTGE smo delno določili vrste mikoriznih in ostalih gliv. Z molekularno določitvijo gliv v koreninah jagod smo želeli poenostaviti dokazovanje mikoriznih gliv na osnovi spor in škodljivih gliv na osnovi gojenja na različnih gojiščih. Vzorce za določanje z molekulskimi metodami smo odbrali na osnovi rezultatov mikorizne kolonizacije. S TTGE smo dokazali prisotnost gliv iz rodu *Glomus* sp. in *Glomus intraradices* ter prisotnost škodljive glive *Rhizoctonia* sp. V primerjavi kontrolnih vzorcev in vzorcev iz obravnavanja Es na elektroferogramu smo ugotovili veliko razliko med pogostnostjo posameznih fragmentov DNA. V kontrolnih vzorcih je bilo več različnih mikoriznih gliv kot v vzorcih z Es. Biocidne rastline na stopnjo kolonizacije niso vplivale tako močno kot na zastopanost oz. raznolikost posameznih vrst mikoriznih gliv.



## SUMMARY

Intensive strawberry production (*Fragaria x ananassa* Duch.) requires a change of soil cultivation and plant protection due to the growing concern for the environmental protection, care for human health and increasing transition to organic production. The quantity and quality of strawberry yield are directly affected by physical, chemical and biological soil properties. In all cultivation technologies great emphasis has to be paid to the position of strawberry field, its location, soil cultivation with respect to the multiannual crop rotation with suitable plants. This is to avoid a unilateral depletion of nutrients from soil and the most serious problem with soil pathogens which present one of the greatest issues in the strawberry production. In the very intensive strawberry technologies, crop rotation replaces chemical disinfection which is harmful and environmentally unfriendly. In sustainable agriculture, solarization and biofumigation are alternative methods of soil disinfection which can reduce the crop rotation to one to two years. All disinfection methods affect the pathogen and beneficial microorganisms (MO), including the AM fungi and DSE fungi. The effect of alternative methods on the beneficial MO and the indirect effect on yield depend on the type of disinfection, the growing and climatic conditions and the cultivated crops. Monitoring the impact of disinfection methods on MO with conventional methods (Trouvelot's evaluation of mycorrhiza colonization) is slow, so we also included molecular methods (PCR and TTGE) which were used for the evaluation of the impact of different alternative soil disinfection methods on the beneficial MO and determination of their diversity.

The effect of solarization and biofumigation on plant growth, mycorrhiza and DSE was evaluated in a pot experiment conducted in the protected environment for three years and in a field experiment conducted for one year. We compared the effect of alternative disinfection methods to that of chemical disinfection with dazomet and the control treatment. In the pot experiment, solarization was carried out by heating the soil to 37 °C while biofumigation was performed by adding the Bj, Sa and Es ground biocidal plants. In the pot experiments half of the plants of each treatment were inoculated with natural mycorrhizal inoculum produced by growing the VA mycorrhiza on maize roots in the soil coming from an ecologic strawberry field. In the field experiment the soil was solarised with black and transparent foil for 6 and 9 weeks. Biofumigation was carried out with green manure using the Bj, Sa and Es biocidal plants and compared with green manure using the Vf non-biocidal plant.

The conditions in the soil were essentially changed due to alternative disinfection methods, especially biofumigation. On the basis of soil analyses made before and after the pot experiment, neutral or beneficial effect of green manure with biocidal plants and solarization on strawberry growth and development of beneficial AM fungi was proved. Solarization and biofumigation contributed to higher soil quality by raising the content of organic matter and nutrients in soil and the reestablishment of favourable ratio between beneficial and pathogenic MO. The Brassicaceae plants provide a significant effect on the N supply for the next culture (Smith et al., 2004; Marchetti et al., 2008). Even though in the field experiment with Sa the lowest quantity of organic mass was incorporated into the soil, the effect on the yield was very good. The effect of Sa was the most favourable in the pot experiments, too.

In the field experiment, different amount of organic mass and that of GSL was incorporated with biocidal plants in soil. In the pot experiment we always added the same amount of biocidal organic mass.

In the strawberry production, next to diseases, weeds are the biggest problem. Treatment with herbicides is difficult and expensive because it requires herbicides with selective activity. In the IP and EKO production the direct use of herbicides is not permitted. Planting on foil reduces the growth of weeds, but not those in the planting holes where they still present a problem. The majority of soil disinfectants have herbicidal effect. Recent chemical disinfectants are more selective and less effective than MB. In our field and pot experiments, dazomet was successful if compared with alternative methods. Crop rotation with plants for green manure has a significant influence on the physical soil properties and increased weediness (Lazzeri and Manichi, 2001). In the field experiment, treatments with biocidal plants had more weeds. The number of weeds in all treatments with green manure, including biocidal plants, was bigger, probably due to the increased organic matter in soil. The maximum weediness was observed in the Vf treatment and the minimum one in the Sa treatment. We can not confirm the hypothesis that biofumigation reduces the weeds, because in all experiments only the Sa treatment reduced the weed growing. Solarization with the transparent foil in the field experiment has the greatest influence on weeds among alternative methods. There was no statistical difference between solarization treatment and dazomet treatment. In pot experiments, Sa treatment had the greatest influence on weeds and it was not statistically different from D treatment.

The strawberry mycorrhizal colonization is influenced by external, genetic and technological factors (Branzanti et al., 2002; Duncan, 2002; Vestberg et al., 2002). The incorporation of large amount of organic mass increases the amount of nutrients and MO in the soil. The average mycorrhizal colonization in the field experiment was lower in comparison with that in the pot experiments. The main reason for that was the difference between the natural environment and the isolated conditions in the greenhouse. In the root samples from all experiments we observed primarily arbuscules and hyphae, rarely vesicles, but no coils. We also observed unknown fungi structures which presumably belonged to DSE or to pathogenic fungi. The reason for the low presence of vesicles, which are store structures, was found in a short mycorrhizal colonization of plants. The frequency of strawberry mycorrhiza was very high in our experiments, with the exception of dazomet treatments. In the field experiment it ranged from 37 % to 55.5 % and in the LP I and LP II without MI it ranged from 47.3 % to 96 %. The frequency of mycorrhiza was higher in the MI treatments. The responses of strawberries in different treatments to AM inoculation were varied. Some of them gained with the inoculation, other incurred a loss (Stewart et al., 2005). With the biofumigation, too, some of the beneficial MO (aerobic bacteria, gram negative bacteria, free living nematodes, *Pseudomonas* spp. and actinomycetes) gained or incurred a loss (Scott and Kundsén, 1999; Riga, 2007; Mattner et al., 2008). The biocidal plant toxicity is avoided by sowing or planting the succeeding crop a few weeks after the incorporation of biocidal plants (Scott and Kundsén, 1999). From the data of the impact of biocidal plants on mycorrhizal colonization and control treatment (without MI) a very small negative effect of biocidal plants on mycorrhizal colonization (field experiment, LP II) or even their beneficial effect (LP I and LP III) was observed. The

data were the same in other mycorrhizal parameters (M%, m%, A%, a%). The values achieved by other parameters in our experiment were very low (Branzanti et al., 2002).

In the Slovenian climatic conditions the combination of solarization and biofumigation is a perspective technological step because with solarization it is difficult to achieve the required amount of high temperatures. In the field experiment we proved a beneficial or neutral effect of solarization on the beneficial soil MO. We achieved higher soil temperature under transparent foil than under the black one. The differences decreased with the depth. Under transparent foil in the field experiment the critical temperature of 37 °C at the depth of 10 cm was exceeded in 6 days. The duration of high soil temperatures in all types of covering was too short. Transparent foil in the field experiment undoubtedly reduced weeds in comparison with other alternative methods and the control treatment but did not have any influence on the mycorrhizal colonization and yield. Under transparent foil the majority of DSE or unknown fungi were observed. In comparison with other treatments, mycorrhiza was the most developed under black foil. The duration of solarization had an effect on mycorrhiza. In the treatment which was three weeks longer covered with transparent foil, F was by 5.4 % lower and under black foil it was lower by 2.9 %.

Chemical disinfection of soil destroys the mycorrhiza or inhibits its development of (McGraw and Hendrix, 1986; Branzanti et al., 2002). The presence of individual MO species in soil is highly influenced by seasons. Chemical disinfection has a diversified effect on the AM fungi. In the field experiment the effect of dazomet was minimal. The frequency of strawberry mycorrhiza in the dazomet treatment was only by 1 % lower in comparison with the control treatment. The reason for the poor effect of dazomet on the mycorrhiza fungi in the field experiment may have been the external factors and the high soil re-mycorrhization (Niemi and Vestberg, 1992). In the pot experiments dazomet almost completely destroyed the mycorrhizal fungi.

The AM colonized plants are more efficient in obtaining nutrients and water, less susceptible to diseases and more productive in current growing conditions than the non-mycorrhizal ones, however, there are no explicit relations between yield and mycorrhizal colonization (Smith and Read, 1997; Vestberg et al., 2002). Inoculation with natural inoculum influences the level of colonization, but it is not necessarily expressed in a higher yield (Regvar et al., 2003; Gosling et al., 2006). In most experiments, mycorrhiza had a beneficial effect on the growth and yield of strawberries. Inoculated plants had a greater mass of roots and shoots, larger fruits and higher yield (Paraskevopoulou-Paroussi et al., 1997; Matsubara et al., 2004; Sharma and Adholeya, 2004). However, the effect of mycorrhizal fungi on the growth and yield of strawberries may also be negative (Taylor and Harrier, 2001; Stewart et al., 2005). From the results obtained in the field experiment we could not confirm that the intensity of growth and the quantity of yield were dependent on the frequency or intensity of mycorrhiza. We can confirm the influence of F% and growth (mass of leaves) only in the LP III, and the interaction of yield, F% and M% in the LP I and LP III. AM are obligate biotrophic fungi dependent on their host. Usually, they are beneficial, but sometimes they reduce the growth and in certain conditions they become parasites and not symbionts (Schönbeck, 1979). In the field experiment, solarization with

black or transparent foil of different duration achieved the lowest yield. Despite the highest mycorrhiza colonization under the black foil, the yield was the lowest.

During the evaluation of mycorrhiza, in some samples of roots, fungal structures which were not mycorrhizal or pathogenic were detected but they had no negative effect on plant growth. We recognised them as less known and difficult to determine DSE fungi. Their role in the nature is unknown. The share of plants with DSE fungi in the field experiment was very small. In the pot experiments the share of plants with unknown structures was greater. The share of dead plants was greater in the pot experiments. Among the structures in the pot experiments which we could not determine, Tip 4 and Tip 1 dominated. In the field experiment the majority of unknown structures were found with chemical disinfections and under transparent foil while in the pot experiments they were found with Es treatments.

Mycorrhizal, DSE and pathogen fungi were evaluated by microscoping of root samples. We identified the mycorrhiza and other fungi using PCR and TTGE methods. With the molecular methods we wanted to simplify the detection of mycorrhizal fungi on the basis of spores and that of pathogen fungi on the basis of fungi growing on different culture media. We selected the samples for molecular determination on the basis of the results of mycorrhizal colonization. The presence of the genus *Glomus* sp. and the species *Glomus intraradices* and also the presence of the pathogenic fungi *Rhizoctonia* sp. was proved using the TTGE method. In the comparison of the control treatment and the Es treatment in the electroferogram great difference was found between the frequencies of individual DNA fragments. The Es treatment confirmed a decrease in the AM population when compared with the control treatment. Biocidal plants had a greater influence on the diversity of mycorrhizal fungi than on the mycorrhizal colonization.

## 8 VIRI

- Ahlich K., Sieber T.N. 1996. The profusion of dark septate endophytic fungi in non-ectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. *New Phytologist*, 132: 259-270
- Ajwa H.A., Klose S., Nelson S.D., Minuto A., Gullino M.L., Lamberti F., Lopéz-Aranda J.M. 2003. Alternatives to methyl bromide in strawberry production in the United States of America and the Mediterranean region. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 220-244
- Ajwa H.A., Trout T. Drip Application of Alternative Fumigants to Methyl Bromide for Strawberry Production. 2004. *HortScience*, 39, 7: 1707-1715
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3: 403-410
- An M., Pratley J., Haig T. 1998. Allelopathy: from concept to reality, <http://www.csu.edu.au/special/agronomy/papers/314/314.html> (14. jan. 2012)
- Andrade-Linares D.R., Grosch R., Restrepo S., Krumbein A., Franken P. 2011. Effect of dark septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza*, 21: 413-422
- Angus, J.F., Gardner P.A., Kirkegaard J.A., Desmarchelier J.M. 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of take-all fungus. *Plant and Soil*, 162: 107-112
- Arcuti P., Di Stefano A., Lazzeri L., Manici L.M., Rosati C. 2001. Solarizzazione e sovesci su fragola alternativi al bromuro di metile. *L'Informatore Agrario*, 37: 51-54
- Asao T., Kitazawa H., Ban T., Pramanik M.H.R. 2008. Electrodegradation of root exudates to mitigate autotoxicity in hydroponically grown strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants. *HortScience*, 43,7: 2034-2038
- Azcón-Aguilar C., Barea J.M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6: 457-464
- Azcón-Aguilar C., Barea J.M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potential. *Scientia Horticulturae*, 68: 1-24
- Barrow J.R. 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, 13: 239-247
- Bartual R., Cebolla V., Bustos J., Giner A., López-Aranda J.M. 2002. The Spanish project on alternatives to methyl bromide (2): the case of strawberry in the srea of Valencia. *Acta Horticulturae*, 567: 431-434

- Baruzzi G., Faedi W., Mosconi F., Fiori R. 1997. Solarizzazione del terreno da coltivare a fragola. *L'Informatore Agrario*, 42: 39-42
- Baruzzi G., Branzanti B., Faedi W., Gentili M., Lucchi P., Neri D. 2000. Effetto della micorrizzazione e della sostanza organica su piante di fragola. *Rivista di Frutticoltura* 12: 83-88
- Baruzzi G., Ballini L., Sbrighi P., Faedi W. 2011. Indagine sulla produzione 'bio' in Italia: interesse crescente, ma redditi difficili. *Rivista di Frutticoltura*, 5: 24-28
- BASF.1997. Basamid Granular sample label. BASF Corp., Research
- Benlioğlu S., Boz Ö., Yildiz A., Kaşkavalci G., Benlioğlu K. 2005. Alternative Soil Solarization Treatments for the Control of Soil-borne Diseases and Weeds of Strawberry in the Western Anatolia of Turkey. *Phytopathology*, 153: 423-430
- Bending G.D., Lincoln S.D. 1999. Characterisation of volatile sulphur containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 31, 5: 695-703
- Berg G. 2007. Biological Control of Fungal Soilborne Pathogens in Strawberries. V: Biological control of plant diseases. Chincholkar S.B. in Mukerji K.G. (ur.). New York. Haworth Food & Agricultural Products Press, 1-15
- Berljak J., Viršček Marn M., Koron D. 2003. In vitro plant regeneration from somatic tissue of strawberry *Fragaria x ananassa* Duch. *Acta biologica slovenica*, 46, 1: 47-51
- Bewick T.A. 1989. Use of soil sterilants in Florida vegetable production, *Acta Horticulturae*. 255: 61-72
- Brandán E.Z., Salazar S. Brandán de Weht C.I. Ortiz N. del V. 2002. Plant harvest index and VA mycorrhizae evaluation in frigo strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Selva) plants in a highland nursery. *Acta Horticulturae*, 567: 293-295
- Branzanti M.B., Gentili M., Neri D. 1998. Controllo del marciume del colletto in fragola mediante funghi micorrizici arbuscolari. *Rivista di Frutticoltura*, 12: 77-80
- Branzanti M.B., Gentili M., Perini R., Neri D., Cozzolino E. 2002. The mycorrhizal status of strawberry plants under different pre planting and cultivation techniques in the field. *Acta Horticulturae*, 567: 495-489
- Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A. Elander R.P. 1998. Applications of PCR in mycology. Bridge P.D. (ur.). Velika Britanija, CAB international, 357 str.
- Brown J., Morra M.J. 2005. Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests, subcontract. University of Idaho, ZDA, Report, NREL/SR-510-35254, 95 str.

- Bringhurst R.S. in Godoy J. 1997. Comparing solarization soil treatment with methyl-bromide soil fumigation on strawberries. *HortScience*, 32, 3: 504-505
- Bryant D. 2003. Biofumigation monitored with Brassica cover crops.  
<http://westenfarmpress.com/newsarticle.asp> (14. jan. 2012)
- Bull C.T., Muramoto J., Koike S.T., Leap J., Shennan C., Goldman P. 2005. Strawberry Cultivars and Mycorrhizal Inoculants Evaluated in California Organic Production Fields.  
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/research/2005/strawberry/> (15. jan. 2012)
- Cameron D.D. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi as (agro)ecosystem engineers. *Plant and Soil*, 333: 1-5
- Cavanni P., Montuschi C., Maltoni M.L. 1996. Alternariosi della fragola: primi risultati di saggi per la resistenza varietale. *Rivista di Frutticoltura*, 6: 47-50
- Cebolla V., Bartual R., Busto J., Giner A. 2002. New chemicals as possible alternatives to methyl bromide in the area of valencia: preliminary results. *Acta Horticulturae*, 567: 435-438
- Chandler C.K., Legard D.E., Noling J.W. 2001. Performance of strawberry cultivars on fumigated and nonfumigated soil in Florida. *HortTechnology*, 11, 1: 69-71
- Charron C.S., Sams C.E. 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 124, 5: 462-467
- Charron C.S., Sams C.E. 2004. Glucosinolate content and myrosinase activity in rapid-cycling *Brassica oleracea* grown in a controlled environment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 3: 321-330
- Chase C.A., Sinclair T.R., Chellemi D.O., Olson S.M., Gilreath J.P., Locascio S.J. 1999. Heat-retentive films for increasing soil temperatures during solarization in a humid, cloudy environment. *HortScience*, 34, 6: 1085-1089
- Chellemi D.O., Olson, Mitchell D.J., Secker I, McSorley R. 1997. Adaptation of soil solarization to the integrated management of soilborne pests of tomato under humid conditions. *Phytopathology*, 87, 3: 250-258
- Chellemi D.O. 2002. Nonchemical management of soilborne pests in fresh market vegetable production systems. *Phytopathology*, 92, 12: 1367-1372
- Chew F.S. 1999. Biological effects of glucosinolates. V: Biologically Active Natural Products. Cutler H.G., Cutler S.J.(ur.) ZDA, CRC Press LLC: 155-181

- Christians N. 2001. Corn-based extracts for weed control.  
<http://www.gcsaa.org/gcm/2001/nov01/11cornbase.html> (15. jan. 2012)
- Clapp J.P., T. Helgason T.J., Daniell J.P.W., Young. 2002. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. V: Ecological studies: Mycorrhizal ecology. Van der Heijden M.G.A. in Sanders I.R. (ur.), Berlin, Springer-Verlag, 157: 201-224
- Coley-Smith J.R. 1980. Sclerotia and other structures in survival. V: The biology of *Botrytis*, Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R. (ur.). London, Academic Press, 85-15
- Cornejo P., Azcón-Aguilar C., Barea J.M., Ferrol N. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Letters, 241: 265-270
- Curto G., Lazzeri L., Dallavalle E., Santi R., Malaguti L. 2006. Sovesci di piante biocidi contro *Meloidogyne incognita*. L'Informatore Agrario, 48: 52-56
- D'Anna F., Bonomo, G., Moncada A., Guarino A., Catalano G., Prinzivalli C. 2005. Alternative al bromuro di metile nella disinfestazione del terreno coltivato a fragola. L'Informatore Agrario, 25: 37-40
- Daugovish O., Downer J., Becker O. 2003. Exploring biofumigational potential of mustards. <http://mbao.org/2003/006%20daugovishombao-summary.pdf> (7. okt. 2008)
- Davison E. McKay A. 1999. Enhanced biodegradation of soil-applied pesticides. Horticulture Biofumigation Update, 9: 2
- De Ceuster H., Pauwels F. 1995. Soil disinfestations in the Belgian horticulture – a practice view. Acta Horticulturae, 382: 37-50
- De Souza F.A., Kowalchuk G.A., Leeflang P., van Ven J.A., Smith E. 2004. PCR-Denaturing Gradient Gel electrophoresis Profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 3: 1413-1424
- Demir S., Akkopru A. 2007. Use of arbuscular mycorrhizal fungi for biocontrol of soilborne fungal plant pathogens. V: Biological control of plant diseases. Chincholkar S.B. in Mukerji K.G. (ur.). New York. Haworth Food & Agricultural Products Press, 17-46
- Dilley C.A., Nonnecke G.R., Christians N.E. 2002. Corn-based extracts to manage weeds and provide nitrogen in matted-row strawberry culture. HortScience, 37, 7: 1053-1056



- Dolinšek J.A. 2007. Rastline in razstrupljanje okolja, onesnaženega s težkimi kovinami. *Proteus*, 70, 2: 57-63
- Duncan J.M. 2002. Prospects for integrated control of phytophthora diseases of strawberry. *Acta Horticulturae*, 567: 603-610
- Duniway J.M. 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology*, 92, 12: 1337-1343
- Egner H., Riehm, H., Domingo, W.R., 1960. Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Böden. II. Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor- und Kaliumbestimmung. *Kgl. Lantbruskögsk. Bd. 26*, 199-215
- Eitel J. 1995. The effectiveness of dazomet as influenced by the use of plastic sheeting. *Acta Horticulturae*, 382: 104-109
- Faedi W., Mourgues F., Rosati C. 2002. Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. *Acta Horticulturae*, 567: 51-59
- Fahey J.W., Zalemann A.T., Talaly P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56: 5-51
- Fennimore S.A., Haar M.J., Goodhue R.E., Winterbottom C.Q. 2008. Weed control in strawberry runner plant nurseries with methyl bromide alternative fumigants. *HortScience*, 43, 5: 1495-1500
- Ferguson L.M., Louws F.J., Abad Z.G., Fernandes G.E., Poling E.B., Brannen P.M., 2003. Impact of alternatives on strawberry yield and root colonization by fungal pathogens. <http://mbao.org/2003/056%20louwsffergusonetal2003.pdf> (9. dec. 2011)
- Filion M., St-Arnaud M., Jabaji-Hare S.H. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using Real-Time Polymerase Chain Reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology*, 93, 2: 229-235
- Fort S.B., Shaw D.V. 1998. Phenotypic correlations between root and shoot traits of strawberry in fumigated and nonfumigated soils. *HortScience*, 33, 2: 222-224
- Gardiner J.B., Morra M.J., Eberlein C.V., Brown P.D., Borek V. 1999. Allelochemicals released in soil following incorporation of rapeseed (*Brassica napus*) green manures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 9: 3837-3842
- Gengotti S., Lucchi C. 2000. Consigli utili per la coltivazione della fragola con tecniche biologiche in Emilia-Romagna. *Rivista di Frutticoltura*, 12: 60-62

- Gengotti S., Tisselli V., Lucchi C., Nasolini T. 2001. La coltivazione della fragola in biologico. *L'Informatore Agrario*, 27: 45-48
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet M.N., Van Tuinen D., Redecker D., Wipf. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20: 519-530
- Gill H.K., McSorley R., Treadwell D.D. 2009. Comparative performance of different plastic films for soil solarization and weed suppression. *HortTechnology*, 19, 4: 769-774
- Gilreath J.P., Motis T.N., Santos B.M., Noling J.W., Locascio S.J., Chellemi D.O. 2005. Resurgence of soilborne pests in doublecropped cucumber after application of methyl bromide chemical alternatives and solarization in tomato. *HortTechnology*, 15,4: 797-801
- Giovanetti M. in Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500
- Glavina T. 2005. Diverziteteta gliv nekaterih halofitov sečoveljskih solin. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 113 str.
- Gosling P., Hodge A., Goodlass G., Bending G.D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 113: 17-35
- Graham J.H. 1988. Interaction of mycorrhizal fungi with soilborne plant pathogens and other organisms. *Phytopathology*, 78, 3: 365-366
- Greenberger A., Yogev A., Katan J. 1987. Induced suppressiveness in solarized soils. *Phytopathology*, 77, 12: 1663:1667
- Gryndler M., Vosátka M., Hršelová H., Catská V., Chvátalová I., Jansa J. 2002. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria on growth and mineral nutrition of strawberry. *Journal of plant nutrition*, 25, 6: 1341-1358
- Grünig R.C., Sieber N.T., Rogers S.O., Holdenrieder O. 2002. Genetic variability among strains of *Phialocephala fortinii* and phylogenetic analysis of the genus *Phialocephala* based on rDNA ITS sequence comparison. *Canadian Journal of Botany*, 80, 12: 1239-1249
- Gullino M.L., Minuto A., Garibaldi A. 2002. Evoluzione della difesa in orticoltura sostenibile. *L'Informatore Agrario*, 18: 77-79
- Gullino M.L., Spadaro D., Garibaldi A. 2005. Integrated approaches for soil disinfestation. *Acta Horticulturae*, 698: 91-98

- Harding R. 2001. In *Vitro* suppression of potato pathogens by volatiles released from *Brassica* residues. Horticulture Biofumigation Update, 14: 2
- Hancock J.F., Callow P.W., Serce S., Schilder A.C. 2001. Relative performance of strawberry cultivars and native hybrids on fumigated and nonfumigated soil in Michigan. HortScience, 36, 1: 136-138
- Harris D.C. 1991. A comparison of dazomet, cloropikrin and methyl bromide as soil disinfectants for strawberries. Journal of Horticultural Science, 66, 1: 51-58
- Harvey S.G., Hannahan H.N., Sams C.E. 2002. Indian mustard and allyl isothiocyanate inhibit *Sclerotium rolfsii*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127, 1: 27-31
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? Nature: 384: 431
- Horowitz M., Regev Y., Herzlinger G. 1983. Solarization for weed control. Weed Science, 31: 170-179
- Ioannou N., Ioannou M. 2002. Integrated management of soil-born pathogens of greenhouse tomato in Cyprus. Acta Horticulturae, 579: 433-438
- Irzykowska L., Irzykowski W., Jarosz A., Golebniak B. 2005. Association of *Phytophthora citricola* with leather rot diseases of strawberry. Journal of Phytopathology, 153: 680-685
- Johnson M.S., Fennimore S.A. 2005. Weed and crop response to colored plastic mulches in strawberry production. HortScience, 40, 5: 1371-1375
- Jordan N.R., Zhang J., Huerd S. 2000. Arbuscular – mycorrhizal fungi: potential roles in weed management. Weed Research, 40: 397-410
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? Mycorrhiza, 11: 207-211
- Jumpponen A., Trappe J.M. 1998. Dark-septate root endophytes: a review with special reference to facultative biotrophic symbiosis. New Phytologist, 140: 295-310.
- Kabir Z., Fennimore S.A., Duniway M., Martin F.N., Brown G.T., Winterbottom C.Q., Ajwa H.A., Westerdahl B.B., Goodhue R.E., Haar M.J. 2005. Alternatives to methyl bromide for strawberry runner plant production. HortScience, 40, 6: 1709-1715
- Kang J.Y., Ibrahim K.E., Juvik J.A., Kim D.H., Kang W.J. 2006. Genetic and environmental variation of glucosinolate content in chinese cabbage. HortScience, 41, 6: 1382-1385

- Karajeh M.R., Masoud S.A. 2006. Molecular detection of *Verticillium dahliae* Kleb. in asymptomatic olive tress. *Journal of Phytopathology*, 154: 496-499
- Karasawa T., Kasahara Y., Takebe M., 2002. Differences in growth responses of maize to preceding cropping caused by fluctuation in the population of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 6: 851-857
- Katan J. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. *Phytopathology*, 66: 683-688
- Katan J. 1981. Solar heating (solarization) of the soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology*, 19: 211-236
- Katan J., Fishler G., Grinstein A. 1983. Short- and long- term effects of soil solarization and crop sequence on Fusarium wilt and yield of cotton in Israel. *Phytopathology*, 73: 1215-1219
- Katan J. 1983. Soil solarization. *Acta Horticulturae*, 152: 227-236
- Kirkegaard J.A., Wong P.T.W., Desmarchelier J.M., Sarwar M. 1996. Suppression of soil-borne cereal pathogens and inhibition of wheat germination by mustard seed meal. *Proceedings 8<sup>th</sup> Australian Agronomy Conference Toowoomba*, 353-356
- Kirkegaard J. 2001. Does incorporation strategy hold the key to biofumigation success? *Horticulture Biofumigation Update*, 14 : 1
- Kirkegaard J. 2004. Proof of concept! Fundamental research proves its worth in bacterial wilt control. *Horticulture Biofumigation Update*, 20 : 1-2
- Kitazawa H., Asao T., Ban T., Pramanik M.H.R. Hosoki T. 2005. Autotoxicity of root exudates from strawberry. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80, 6: 677-680
- Koron D., Brence A., Caf A. 2010. Pridelava jagodičja v Sloveniji v letu 2010. *Sad*, 21, 12: 3-5
- Koron D. 2011. Jagodičje: gojenje in uporaba. *Kmečki glas, Slovenija*, 122 str.
- Kramberger B. 2001. Bela gorjušica – uporabna rastlina za podor. *Kmetovalec*, 69, 8: 7-8
- Landa B.B., Navas-Cortés J.A., Hervas A., Jimenéz-Díaz R.M. 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology*, 91, 8: 807-816
- Lazzeri L., Manici L.M., Baruzzi G., Malaguti L., De Paoli E., Antoniaci L. 1999. Primi risultati sull'azione dei sovesci di piante biocidi nella coltura della fragola. *Rivista di Frutticoltura*, 6: 20- 26

- Lazzeri L., Manici L.M. 2001. Allelopathic effect of glucosinolate-containing plant green manure on *Pythium* sp. and total fungal population in soil. *HortScience*, 36, 7: 1283-1289
- Lazzeri L., D'Avino L., Malaguti L., Lazzari A. 2009. Potenzialità applicative di nuovi materiali solidi e liquidi per la biofumigazione. *Rivista di Frutticoltura*, 6: 28-34
- Leandro L.F.S., Ferguson L.M., Louws F.J., Fernandez G.E. 2007. Strawberry growth and productivity in fumigated compared to compost-amended production system. *HortScience*, 42, 2: 227-231
- Light K. 2001. Mustard hits bacterial wilt. *Horticulture Biofumigation Update*, 14: 2
- Likar M., Regvar M. 2009. Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of the Total Environment*, 407: 6179-6187
- Linderman R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, 78: 366-371
- Longato S., Bonfante P. 1997. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycological research*, 101: 425-432
- López-Aranda J.M., Medina J.J., Miranda L., Bartual R., Cebolla V., Domínguez F., López-Medina J. 2002. The Spanish project on alternatives to methyl bromide: The case of strawberry in the area of Huelva. *Acta Horticulturae*, 567: 427-429
- López-Aranda J.M., Miranda L., Medina J.J., Soria C., Santos B., Romero F., Pérez – Jiménez R.M., Talavera, M., Fennimore S.A., Santos B.M. 2009. Methyl bromide alternatives for high tunnel strawberry production in southern Spain. *HortTechnology*, 19, 1: 187-192
- López-Martinez N., Castillo S., Aguirre I., Gonzalez-Zamora J.E., Avilla C., López-Medina J. 2006. Effect of biofumigation on typical weeds of strawberry fields. *Acta Horticulturae*, 708: 193-196
- López-Medina J., López-Aranda J.M., Medina J.J., Miranda L. 2003. Chemical and non-chemical alternative to methyl bromide fumigation of soil for strawberry production. *Journal of Horticultural science & Biotechnology*, 78, 5: 597-604
- Maček I. 2009. Molekulski pristopi pri raziskavah arbuskularne mikorize. *Acta agriculturae Slovenica*, 93-1: 77-85
- Malusa E., Sas-Paszt L., Popińska W., Żurawicz E. 2006. The effect of a substrate containing arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms (*Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces*) and foliar fertilization on

- growth response and rhizosphere pH on three strawberry cultivars. *International Journal of Fruit Science*, 6, 4: 25- 41
- Mappes D. 1995. Spectrum of activity of dazomet. *Acta Horticulturae*, 328: 96-103
- Marchetti R., Lazzeri L., Malaguti L., Orsi A., Ponzoni G. 2008. Potentially mineralizable nitrogen is soil green manured with biocidal crops. 16<sup>th</sup> IFOAM organic World Congreee, Modena, Italy, June 16-20. <http://orgprints.org/11969> (17. dec. 2011)
- Mark G.L., Cassells A.C. 1999. The effect of dazomet and fosetyl-aluminium on indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi in commercial strawberry production. *Plant and Soil*, 209: 253-261
- Martin F.N., Bull C.T. 2002. Biological approaches for control of root pathogens of strawberry. *Phytopathology*, 92, 12: 1356-1362
- Mass J.L. 1998. Compendium of strawberry diseases. APS Press, ZDA, 98 str.
- Mattner S.W., Gounder R.K., Mann R.C., Porter I.J., Matthiessen J.N., Ren Y.L., Sarwar M. 2006. Ethanedinitrile (C<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) - a novel soil fumigant for strawberry production. *Acta Horticulturae*, 708: 197-203
- Mattner S.W., Porter I.J., Gounder R.K., Shanks A.L., Wren D.J. Allen D. 2008. Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry. *Crop Protection*, 27: 1165-1173
- Matthiessen J. 2002. Plant maceration and moisture hold the key to biofumigation success. *Horticulture Biofumigation Update*, 15: 1-2
- Matthiessen J.N., Shackleton M.A. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Science*, 61, 11: 1043-1051
- Matthiessen J.N., Kirkegaard J.A. 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 3: 235-265
- Matsubara Y., Hirano I., Sassa D., Koshikawa K. 2004. Increased tolerance to fusarium wilt in mycorrhizal strawberry plants raised by capillary watering methods. *Environmental Control in Biology*, 42, 3: 185-191
- Mayton S.H., Olivier C., Vaughn S.F., Loria R. 1996. Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology*, 86, 3: 267-271
- McGuire A. 2003. Green Manuring with Mustard.  
<http://www.aenews.wsu.edu/June03AENews/June03AENews.htm> (6. nov. 2011)

- McGraw A.C., Hendrix J.W. 1986. Influence of soil fumigation and source of strawberry plants on population densities of spores and infective propagules of endogonaceous mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 94: 425-434
- McSpadden Gardener B.B. 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 97: 221-226
- Medina J.J., Miranda L., Romero F., De Los Santos B., Montes F., Vega J.M., Pérez J.I., Bascón J., Soria C., López-Aranda J.M. 2006. Seven years work on alternatives to methyl bromide (MB) for strawberry production in Huelva (Spain). *Acta Horticulturae*, 708: 205-209
- Merchier J., Lego S.F., Jiménez J.I., Baird J. 2007. Soil fumigation with perlite colonized by the volatile-producing fungus *Muscador albus*. *Phytopathology*, 97, 7: 75
- Millner P.D., Mulbry W.W., Reynolds S.L., Patterson CA. 1998. A taxon-specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 8: 17-27
- Millne P.D., Mulbry, W.W., Reynolds S.L. 2001. Taxon-specific oligonucleotide primers for detection of *Glomus etunicatum*. *Mycorrhiza*, 10: 259-265
- Mishra A., Patel C.R., Kothari I.L. 2002. Status of mycorrhizal fungus in turmeric fields subjected to soil solarization. *Mycorrhiza News*, 13, 4: 12-13
- Molina R., Massicotte H., Trappe J.M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. V: *Mycorrhizal Functioning*. Allen, M.J. (ur.). London, Chapman & Hall: 357-423
- Moyano C., Melgarejo P. 2002. Survival of *Botrytis cinerea* in soil in south-eastern Spain. *J. Phytopathology*, 150: 536-540
- Muramoto J. 2003. Nutrient analysis of organic strawberries: effect of cultivars and mycorrhizal inoculation. [http:// ofrf.org/funded/reports/muramoto\\_01f16.pdf](http://ofrf.org/funded/reports/muramoto_01f16.pdf) (5. nov. 2011)
- Norman J.R., Hooker J.E. 2000. Sporulation of *Phytophthora fragariae* shows greater stimulation by exudates of non-mycorrhizal than by mycorrhizal strawberry roots. *Mycological Research*, 104, 9: 1069-1073
- Nehl D. 1999. Biofumigation off to a head start in cotton. *Horticulture Biofumigation Update*, 9: 1
- Neri D., Bonanomi G., Zucconi F., Cozzolino E. 1998. Studi sugli apporti di sostanza organica nel fragoleto. *Rivista di Frutticoltura*, 5: 47-54

- Niemi M., Vestberg M. 1992. Inoculation of commercially grown strawberry with VA mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 144: 133-142
- Noling J.W. 2002. The practical realities of alternatives to methyl bromide: concluding remarks. *Phytopathology*, 92, 12: 1373-1375
- Omirou M., Ioannides M.I., Ehaliotis C. 2013. Mycorrhizal inoculation affects arbuscular mycorrhizal diversity in watermelon roots, but leads to improved colonization and plant response under water stress only. *Applied Soil Ecology*, 63: 112-119
- Overman A.J., Jones J.P., Geraldson C.M. 1965. Relation of nematodes diseases and fertility to tomato production on old land. *Proc.Fla.St.Hort.Sci.* 78: 136-142
- Palermo M.L., Angileri G., Signorino G., Faedi W., Baruzzi G. 2012. Alternative alla fumigazione chimica nella fragolicoltura siciliana *Rivista di Frutticoltura*, 6: 44-48
- Palumbo A.D., Morra L., Bilotto M., Picascia S., Magnifico V. 1999a. La solarizzazione nell'orticoltura di pieno campo della Piana del Sele. *L'Informatore Agrario*, 4: 97-102
- Palumbo A.D., Morra L., Arcuti P. 1999b. Possibilita applicative della solarizzazione del terreno nel Centro-Sud Italia. *Rivista di Frutticoltura*, 6: 28-33
- Paraskevopoulou-Paroussi G., Karagiannidis N., Paroussis E., Spanomitsios G. 1997. The effect of mycorrhiza on nutrient uptake and plant development of three strawberry cultivars. *Acta Horticulturae*, 439: 709-715
- Particka C.A., Hancock J.F. 2005. Field evaluation of strawberry genotypes for tolerance to back root rot on fumigated and nonfumigated soil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 5: 688-693
- Phillips J.M., Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society*, 55, 1: 158-161.
- Pinkerton J.N., Ivors K.L., Reeser P.W., Bristow P.R., Window G.E. 2002. The use of soil solarization for the management of soilborne plant pathogens in strawberry and red raspberry production. *Plant Disease*, 6: 645-651
- Pongrac P. 2004. Privzem in lokalizacija Zn, Cd in Pb pri ranem mošnjaku (*Thlaspi praecox* Wulf.). *Diplomsko delo*, 132 str.
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Tolrà R., Poschenrieder C, Barceló J. 2008. Glucosinolate profiles change during the life cycle and mycorrhizal colonization in a Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* (Brassicaceae). *Journal of Chemical Ecology*, 34:1038-1044



- Porras M., Barrau C., Romero F. 2007. Effect of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. *Crop Protection*, 26: 782-787
- Porter I.J., Mattner S.W., Banks J., Fraser P. 2006. Impact of global methyl bromide phase-out on the sustainability of strawberry industries. *Acta Horticulturae*, 708: 179-185
- Pritts M., Wilcox W.F., 1990. Black root rot disease of strawberry. *Cornell Small Fruits Nwsl.*, 5, 4: 1-2
- Pritts M.P., Kelly M.J. 1993. Alternative weed management strategies for strawberries. *Acta Horticulturae*, 348: 321-327
- Price A.J., Charron C.S., Saxton A.M., Sams C.E. 2005. Allyl isothiocyanate and carbon dioxide produced during degradation of *Brassica juncea* tissue in different soil conditions. *HortScience*, 40, 6: 1734-1739
- Prinzivalli C., D'Anna F., Rosati C. 2001. Solarizzazione con film plastici per la fragola in alternativa al bromuro di metile. *L'Informatore Agrario*, 37: 55-57
- Pullman G.S., DeVay J.E. Garber R.H. 1981. Soil solarization and thermal death: a logarithmic relationship between time and temperature for four soilborne plant pathogens. *Phytopathology*, 71: 959-964
- Ramirez-Villapudua J., Munnecke D.E. 1988. Effect of solar heating and soil amendments of cruciferous residues of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and other organisms. *Phytopathology*, 78: 289-295
- Razik A.A., Grinstein A., Zeydan O., Rubin B., Tal A., Katan J. 1989. Soil solarization and fumigation of strawberry plots. *Acta Horticulturae*, 265: 586-590
- Redecker D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, 10: 73-80
- Regvar M., Vogel-Mikuš K., Ševerkar T. 2003. Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot and tomato. *Folia Geobotanica* 38:223-234
- Reynolds L.B., Potter J.W., Ball-Coelho B.R. 2000. Crop Rotation with *Tagetes* sp. is an alternative to chemical fumigation for control of root-lesion nematodes. *Agronomy Journal*, 92: 957-966
- Rice E.L. 1984. Allelopathy. Academic Press, Orlando, ZDA, 423 str.
- Rieger M., Krewer G., Lewis P. 2001. Solarization and chemical alternatives to methyl bromide for preplant soil treatment of strawberries. *HortTechnology*, 11, 2: 258-264

- Riga E. 2007. The effect of Brassica crops on plant parasitic nematodes, free living nematodes, and soil microbial dynamics when used in combination with reduced rates of synthetic nematicides. *Phytopathology, Supplement*, 97, 7: 155
- Rinaudo V., Bàrberi P., Giovannetti M., Van der Heijden M.G.A. 2010. Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant Soil*, 333: 7-20
- Rosati C. 2002. Alternative non chimiche al bromuro di metile. *Rivista di Frutticoltura*, 7-8: 33-37
- Rosen C.J., Fritz V.A., Gardner G.M., Hecht S.S., Carmella S.G., Kenney P.M. 2005. Cabbage yield and glucosinolate concentrations as affected by nitrogen and sulfur fertility. *HortScience*, 40, 5: 1493-1498
- Rotenberg D., Joshi R., Benitez M.S., Chapin L.G., Camp A., Zumpetta C., Osborne A., Dick W.A., McSpadden B.B. 2007. Farm management effects on rhizosphere colonization by native populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. and their contributions to crop health. *Phytopathology*, 97, 6: 756-766
- Rosendahl S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178: 253-266
- Qin Q.M., Vallad G.E., Wu B.M., Subbarao K.V. 2006. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp. *Phytopathology*, 96, 6: 582-592
- Samtani J.B., Gilbert C., Weber B., Subbarao K.V., Goodhue R.E., Fennimore S.A. 2012. Affect of steam and solarization tretaments on pest control, strawberry yield, and economic returnd relative to methyl bromide fumigation. *HortScience*, 47, 1: 64-70
- Saremi H., Amiri M.E., Mirabolfathi M. 2010. Application of soil solarization for controlling soilborne fungal pathogens in newly established pistachio and olive orchards. *International Journal of Fruit Science*, 10: 143-156
- Scagel C.F. 2003. Soil pasteurization and inoculation with *Glomus intraradices* alters flower production and bulb composition of *Zephyranthes* spp. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78, 6: 798-812
- Schreiner R.P., Koide R.T. 1993. Mustards, mustard oils and mycorrhizas. *New Phytologist*, 123: 107-113
- Schreiner P.R., Kelley L.I., Pinkerton J.N. 2001. Soil solarization reduces arbuscular mycorrhizal fungi as a consequence of weed suppression. *Mycorrhiza*, 11: 273-277
- Schönbeck F. 1979. Endomycorrhiza in relation to plant diseases. V: Soilborne Plant Pathogens (Schippers, B. in Gams, W.). Academic Press, New York, 271-280

- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota. Phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105: 1413-1421
- Scott J.S., Knudsen G.R. 1999. Soil amendment effects of rape (*Brassica napus*) residues on pea rhizosphere bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1435-1441
- Seigies A.T., Pritts M. 2006. Cover crop rotations alter soil microbiology and reduce replant disorders in strawberry. *HortScience*, 41, 5: 1303-1308
- Sharma M.P., Adholeya A. 1994. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on the post vitro growth and yield of micropropagated strawberry grown in a sandy loam soil. *Canadian Journal of Botany*, 82: 322-328
- Shaw D.V., Larson K.D. 1999. A Meta-analysis of strawberry yield response to preplant soil fumigation with combinations of methyl bromide-chloropicrin and four alternative systems. *HortScience*, 34, 5: 839-845
- Shaw D.V., Larson K.D. 2001. Relative performance of strawberry genotypes over four cycles of cultivation on fumigated and nonfumigated soils. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 1: 78-82
- Shlevin E., Mahrer Y., Katan J. 2004. Effect of moisture on thermal inactivation of soilborne pathogens under structural solarization. *Phytopathology*, 94, 2: 132-137
- Shlevin E., Mahrer I., Saguy S., Y., Katan J., Siti M., Arbel A., Gamliel A. 2005. Modeling thermal inactivation of soilborne pathogens under structural (dry) and soil (wet) solarization. *Acta Horticulturae*, 698: 167-173
- Simon L., Lalonde M., Bruns T.D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 291-295
- Smith F.A., Smith S.E. 1997. Structural diversity in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 118: 87-93
- Smith B. 2001. A complex mode of action for biofumigation? *Horticulture Biofumigation Update*, 13: 1
- Smith I.M., Dunez J., Lellitt R.A., Phillips D.H., Archer S.A., 1988. *European handbook of plant diseases*. Blackwell scientific Publications. 583 str.
- Smith G.S. 1988. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology*, 78, 3: 371-374
- Smith S.E., Read D.J. 1997. *Vesicular – arbuscular Mycorrhizas. V: Mycorrhizal symbiosis*. Second Edition. Academic press, London: 9-160

- Smith R., Subbarao K., Koike S., Fennimore S., Barber A. 2004. Mustard cover crops for control soilborne disease and weeds, and nitrogen cycling in cool season vegetable production in the salinas valley. *HortScience*, 39, 4: 832
- Snyder A., Morra M.J., Johnson-Maynard J., Thill D.C. 2009. Seed meals from brassicaceae oilseed crops as soil amendments: influence on carrot growth, microbial biomass nitrogen, and nitrogen mineralization. *HortScience*, 44, 2: 354-361
- Sonjak S., Beguiristain T., Leyval C., Regvar M. 2008. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. *Plant Soil*, 314, 1-2: 25-34
- Stapleton J.J., DeVay J.E. 1984. Thermal components of soil solarization as related to changes in soil and root microflora and increased plant growth response. *Phytopathology*, 74: 255-259
- Stapleton J.J., Prather T.S., Mallek S.B., Ruiz T.S., Elmore C.L. 2002. High temperature solarization for production of weed-free container soils and potting mixes. *HortTechnology*, 12, 4: 697-700
- Steffek R., Spornberger A., Altenburger J. 2006. Detection of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil samples and prospects to reduce the inoculum potential of the fungus in the soil. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71, 4: 145-148
- Stewart L.I., Hamel C., Hogue R., Moutoglis P. 2005. Response of strawberry to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi under very high soil phosphorus conditions. *Mycorrhiza*, 15: 612-619
- Stürmer S.L. 2012. A history of the taxonomy and systematic of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*, 22: 247-258
- Su H., Bhat R.G., Gubler D., Browne G.T. 2007. Effect of solarization on survival of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum*, causal agents of crown rots of strawberry in California. *Phytopathology*, Supplement, 97, 7: 111
- Subbarao K.V., Hubbard J.C. 1996. Interactive effects of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and on wilt in cauliflower. *Phytopathology*, 86, 12: 1303-1310
- Taylor J., Harrier L.A. 2001. A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. Elvira (strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 18: 205-215
- Tosi T., Tosi E. 1994. Fumigazione per manichetta di terreni destinati all'impianto di fragoleti. *L'Informatore Agrario*, 28: 71-75

- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi Pearson V. 1986. Measure du taux de mycorrhizaon VA d'un système radiculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. V: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (ur). Paris, INRA: 217-221
- Tsrer L., Lebiush S., Meshulam M., Erlich O., Hazanovsky M., Aharon M., Matan E. Tregerman M., Gamliel A. 2007. Biofumigation for the control of soilborne diseases. *Acta Horticulturae*, 747: 389-394
- Ugrinović, K. 2006. Kaj jemo ko jemo ruolo? Kvardakabra – časopis za tolmačenje znanosti, <http://www.kvardakabra.net/article.php/rukola/print> (2. maj 2009)
- Vandenkoornhuysse P., Leyval C. 1998. SSU rDNA sequencing and PCR- fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia*, 90, 5: 791-797
- Vestberg M., Kukkonen S., Neuvonen E.L., Uosukainen M. 2000. Mycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry – case studies on mineral soil and a mined peat bog. *Acta Horticulturae*, 530: 297-304
- Vestberg M., Kukkonen S., Uosukainen M. 2002. Occurrence and effectiveness of indigenous mycorrhiza of some strawberry fields in Finland. *Acta Horticulturae*, 567: 499-502
- Vestberg M., Kukkonen S., Saari K., Parikka P., Huttunen J., Tainio L., Devos N., Weekers F., Kevers C., Thonart P., Lemoine M.C., Cordier C., Alabouvette C., Gianinazzi S. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, 27: 243-258
- Vrabl S. 1992. Bolezni in škodljivci jagodičevja. Kmečki glas, Ljubljana, 98 str.
- Walker C., Trappe J.M. 1993. Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycological Research*, 97, 3: 339-344
- Weston L.A. 2005. History nad current trends in the use of allelopathy for weed management. *HortTechnology*, 15, 3: 529-534
- Whipps J.M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1198-1227
- White T. J., T. Bruns S. Lee J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A guide to methods and applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York ali <http://findpdf.net/ebooks/books-about-pcr-protocols-a-guide-to-methods-and-applications-free-download.html> (10. jun. 2011)

Williams S.C.K., Vestberg M., Uosukainen M., Dodd J.C. Jeffries P., 1992. Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the *post – vitro* growth of micropropagated strawberry. *Agronomie*, 12: 851-857

Wolf D.C., Dao T.H., Scott H.D., Lavy P.L. 1989. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties. *Journal of Environmental Quality*, 18: 39-44

Yuan Z., Zhang C., Lin F., Kubicek C.P. 2010. Identity, diversity and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5: 1642-1652.

Zabret K. 2002. Dosevki. *Kmetovalec*, 70: 5-7

Zasada I.A., Elmore C.L., Yakabe L.E., MacDonald J.D. 2007. Evaluation of propargyl bromide as a soil fumigant. *HortScience*, 42, 5: 1212-1216

Znaor D. 1996. Plodored – ili komponiranje 'poljske simfonije'. V: *Ekološka poljoprivreda-Poljoprivreda sutrašnjice*. Zavod Globus, Zagreb, 469 str.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se vsem tistim, ki ste vsaj malo verjeli, da mi bo uspelo.

Hvala prof. Marjani Regvar, Silvi Sonjak, Matevžu Likarju in Mileni Kubelj iz Oddelka za biologijo za vse nasvete pri laboratorijskem delu in odkrivanju meni neznanih tehnik molekulske identifikacije gliv. Hvala nekdanji sodelavki Jasni Berljak in Beti Komatar za pomoč pri vzgoji sadik jagod iz tkivne kulture. Za nesebično pomoč pri izvedbi poskusov se zahvaljujem vsem sodelavcem iz sadovnjaka na Brdu pri Lukovici in Boštjanu Sajetu.

Za neizmerno razumevanje in dolgoletno vzpodbujanje - hvala Nikotu, Matiju in Ani ter vsem članom moje širše družine.

## **PRILOGE**



PRILOGA A: Analize glukozinolatov v biocidnih rastlinah v letih 2002 (poljski poskus) in 2003 (lončni poskusi) ( $\mu\text{mol/g ss}$ )

Annex A: Analysis of glucosinolates in biocidal plants in 2002 (field experiment) and 2003 (pot experiments) ( $\mu\text{mol / g dw}$ )

Vrsta rastline	Deli rastline	PRO	SIN	ALY	4OH	GSL2	GBN	GSL3	GSL4	GSL6	GSL7	GSL8	Vsota GSL
V letu 2002													
Bj	listi		8,34										8,34
Sa	listi			19,46		1,35							20,81
Es	listi				0,35	0,26					5,92		6,53
V letu 2003													
Bj	listi			13,50		0,80		0,53		1,98			16,81
Bj	korenine			66,32		4,15							70,47
Sa	listi		5,30					0,40				0,65	6,35
Sa	korenine				0,28			1,07		1,23			2,58
Es	listi	0,28			0,17		3,90		12,24				16,59
Es	korenine	0,71			0,38	0,83	18,43		12,21		3,69		36,25

Legenda:

PRO – progoitrin

SIN – sinigrin

ALY – glukoalizin

4OH – 4-hidroksibrasicin

GBN – glukobrasikanapin

GSL – neidentificirani glukozinolati

PRILOGA B: Količina zaorane biomase in GSL v obravnavanjih z biocidnimi rastlinami (poljski poskus - setev v letu 2002)

Annex B: Quantity of incorporated biomass and GSL in treatments with biocidal crops (field experiment - sowing in 2002)

Rastlina	Lastnosti rastline		Vsebnost GSL v rastlini		GSL dodani tlom*		
	Masa	Suha snov	$\mu\text{mol/g}$ suhe snovi	$\mu\text{mol/g}$ sveže snovi	$\text{mmol/ m}^2$	$\text{mmol/kg}$ zemlje**	$\text{mg/kg}$ zemlje
	$\text{kg/ m}^2$	$\text{mg/g}$					
Bj	4,1	164	8,3	1,36	5,576	0,039	18,0
Sa	2,3	150	20,8	3,12	7,176	0,051	23,5
Es	3,2	126	6,5	0,82	2,624	0,018	8,3
Vf	5,7	/	/	/	/	/	/

\* Preračuno na osnovi podatkov Lazzeri in Manici (2001)

\*\*1m<sup>2</sup> zemlje na srednje težkih tleh je približno 140 kg (Lazzeri in Manici, 2001)

PRILOGA C: Izračun mase rastlin in GSL dodanih substratom v lončnih poskusih (setev v letu 2003)

Annex C: Calculation of the mass of plants and GSL added to the soil in pot experiments (sowing in 2003)

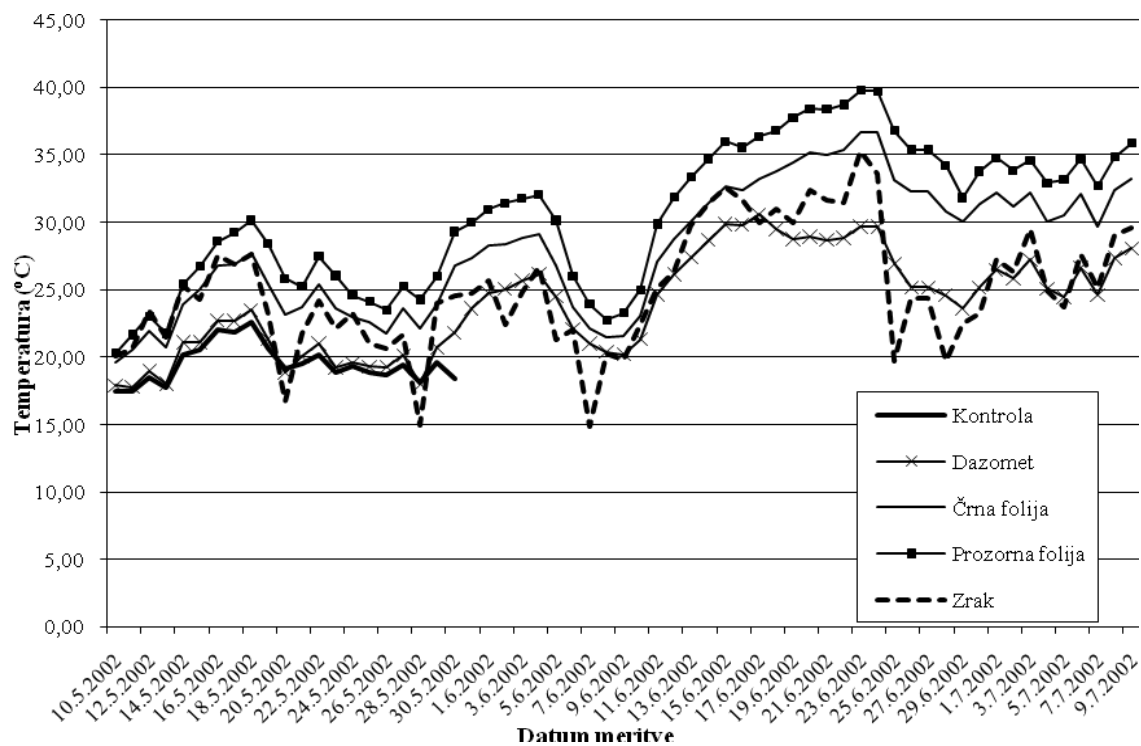
Rastlina	Suha snov mg/g	GSL v rastlini		GSL dodani zemlji*		
		$\mu\text{mol/g}$ suha snov	$\mu\text{mol/g}$ sveža snov	mmol/ lonček (25 g)	mmol/kg zemlje**	mg/kg zemlje
Bj	113	16,8	1,89	0,047	0,171	78,9
Sa	105	6,4	0,67	0,017	0,062	28,6
Es	98	16,6	1,62	0,045	0,163	75,2

\* Preračuno na osnovi podatkov Lazzeri in Manici (2001)

\*\*1m<sup>2</sup> zemlje na srednje težkih tleh je približno 140 kg (Lazzeri in Manici, 2001)

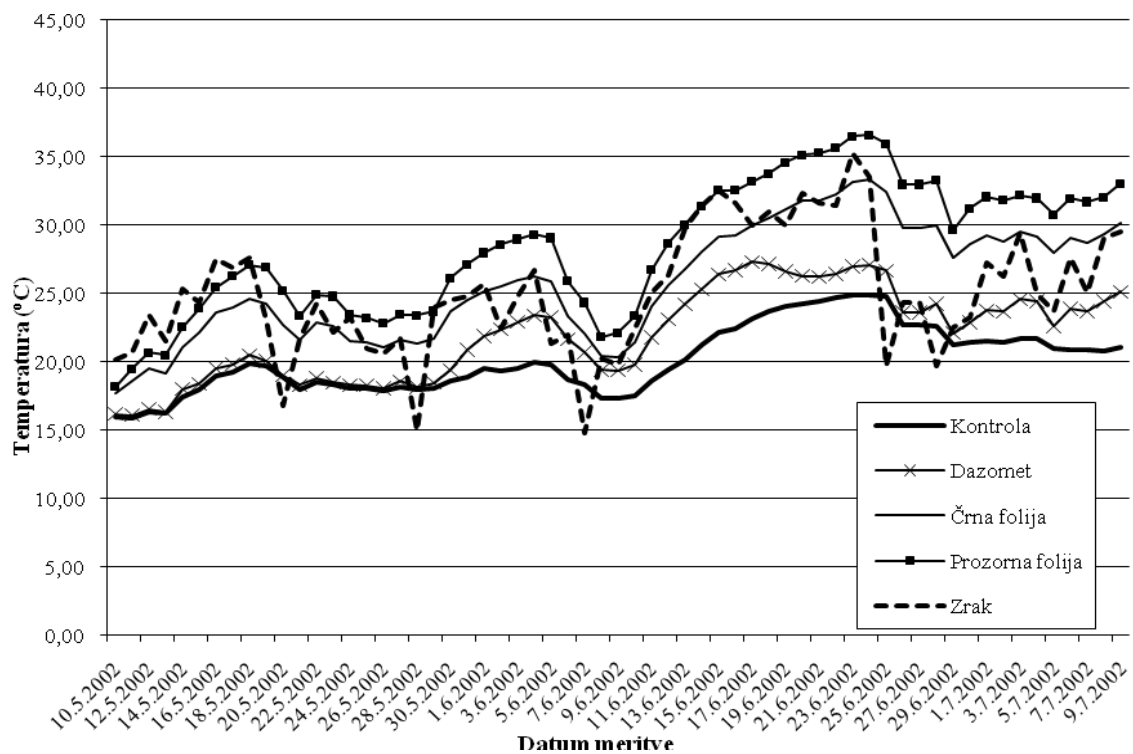
PRILOGA D: Nihanja maksimalne temperature tal pod folijami

Annex D: Oscillation of maximum soil temperature under films



Priloga D-1: Maksimalne temperature tal, dosežene na globini 10 cm pod različnimi folijami in maksimalna temperatura zraka (°C)

Annex D-1: The maximum soil temperature reached at a depth of 10 cm under different foils and maximum air temperature (°C)



Priloga D-2: Maksimalne temperature tal, dosežene na globini 20 cm pod različnimi folijami in maksimalna temperatura zraka (°C)

Annex D-2: The maximum soil temperature reached at a depth of 20 cm under different foils and maximum air temperature (°C)

Priloga D-3: Povprečna in maksimalna temperatura tal dosežena na globinah 10 in 20 cm na nepokritih tleh in pod prozorno in črno folijo (prekrivanje 6 in 9 tednov) ter število ur s temperaturo tal nad 37 °C

Annex D-3: The average and maximum soil temperature reached at the depths of 10 and 20 cm under uncovered and with transparent and black foil covered ground (covering 6 and 9 weeks) and the sum of hours with soil temperature above 37 °C

Tip solarizacije in kontrola	Globina cm	Povprečna temperatura tal °C	Dosežena maksimalna temperatura tal °C	Vsota uri nad 37 °C
SOL PF 6	10	25,7	38,4	80
	20	24,6	35,3	0
SOL PF 9	10	27,4	39,8	170
	20	26,4	36,6	0
SOL ČF 6	10	23,5	35,1	0
	20	22,4	31,9	0
SOL ČF 9	10	25,1	36,7	0
	20	24,0	33,4	0
K	10*	/	/	/
	20	18,1	24,9	0

\*po polovici meritev je bil kabel merilne sonde poškodovan

## PRILOGA E: Izračun mikorizne kolonizacije

### Annex E: Calculation of mycorrhizal colonization

#### Frekvenca mikorize (F%)

$$F\% = (\text{število mikoriznih korenin} / \text{število vseh korenin}) \times 100$$

#### Intenziteta mikorize (M%)

$$M\% = (95 n_5 + 70 n_4 + 30 n_3 + 5 n_2 + n_1) / \text{število vseh korenin}$$

$n_5$  – število fragmentov, razvrščenih v razred 5 ...  $n_1$  – število fragmentov, razvrščenih v razred 1.

Razredi infekcije koreninskih fragmentov:

Razred 0 – fragment ni inficiran

Razred 1 – fragment je inficiran od 0 do 1 %

Razred 2 – fragment je inficiran od 1 do 10 %

Razred 3 – fragment je inficiran od 10 do 50 %

Razred 4 – fragment je inficiran od 50 do 95 %

Razred 5 – fragment je inficiran od 95 do 100 %

#### Intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m%)

$$m\% = M \times \text{število vseh korenin} / \text{število mikoriznih korenin} = M \times 100 / F$$

#### Gostota arbuskulov (A%)

$$A\% = a \times (M / 100)$$

Razred A0 – arbuskuli niso prisotni

Razred A1 – od 0 do 25 % arbuskulov

Razred A2 – od 25 do 50 % arbuskulov

Razred A3 – od 50 do 100 % arbuskulov

#### Gostota arbuskulov v koloniziranih delih korenin (a%)

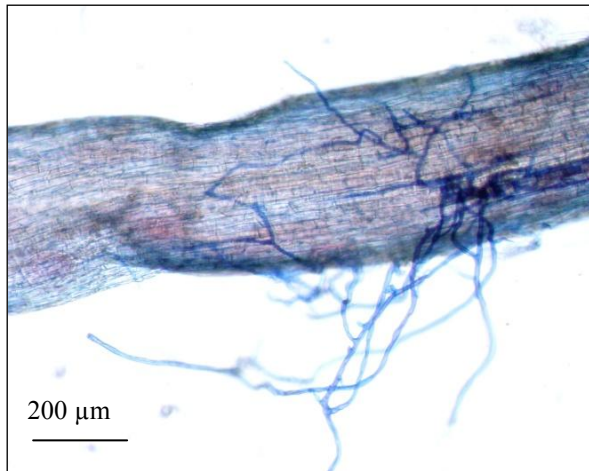
$$a\% = (100m_{A3} + 50 m_{A2} + 10 m_{A1}) / 100$$

$$m_{A1} = ((95n_{5A1} + 70n_{4A1} + 30n_{3A1} + 5n_{2A1} + n_{1A1}) / \text{število mikoriznih korenin}) \times 100 / m$$

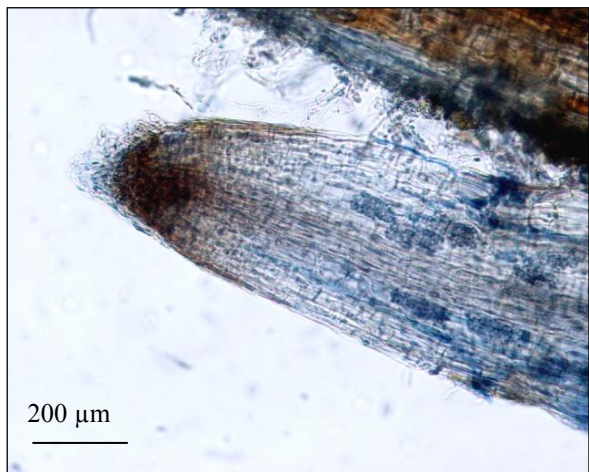
$n_{1A1}$ ,  $n_{2A1}$ , ...,  $n_{5A1}$  = število fragmentov z gostoto arbuskulov A1 v posameznih razredih za mikorizno kolonizacijo in enako za A2 in A3 (Glavina, 2005) .

## PRILOGA F: Mikorizna kolonizacija korenin jagod

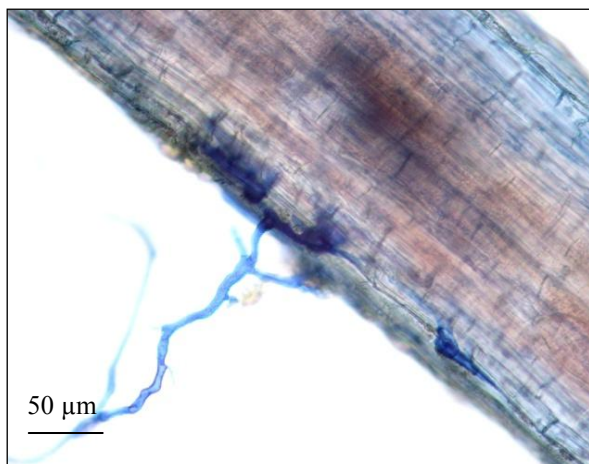
### Annex F: Mycorrhizal colonization of strawberry roots



Priloga F-1: Hife mikorizne glive na korenini jagode (povečava 100 x)  
Hyphae of mycorrhizal fungus on the roots of strawberry (100 x)

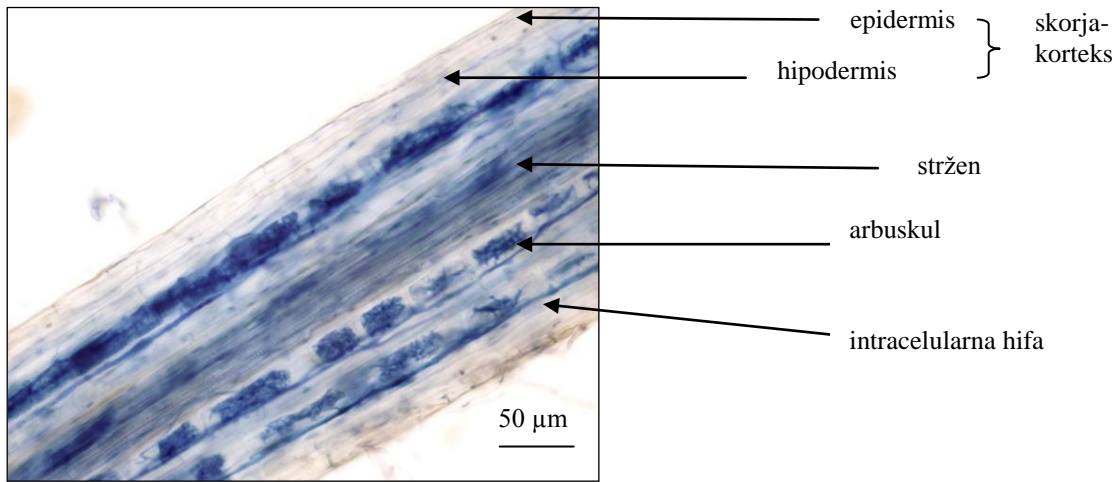


Priloga F-2: Z AM koloniziran rastni vršiček korenine jagode (povečava 100 x)  
With AM colonized growing tips of strawberry root (100 x)

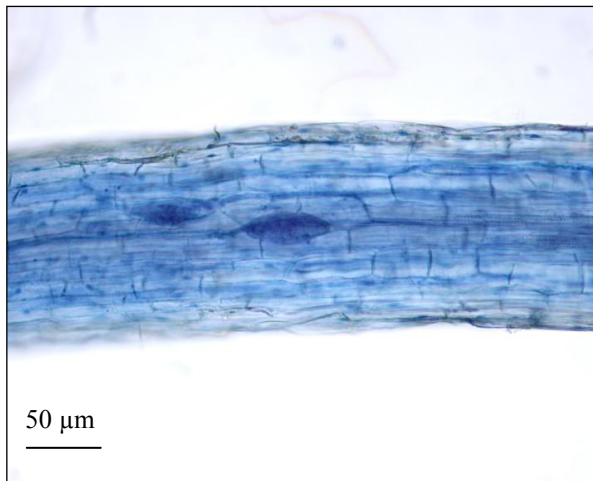


Priloga F-3: Apresorij mikorizne glive na površini korenine jagode (povečava 400 x)  
Appressoria of mycorrhizal fungus on the surface of the root of strawberry (400 x )





Priloga F-4: Arbuskili v korenini jagode (povečava 400 x)  
Arbuscules in the root of strawberry (400 x )



Priloga F-5: Vezikli v korenini jagode (povečava 400 x)  
Vesicles in the root of strawberry (400 x )



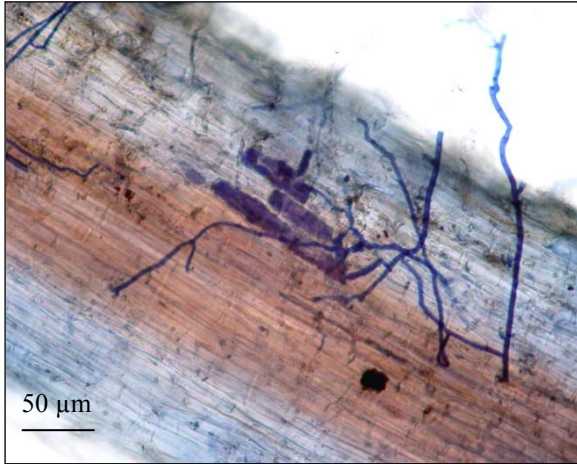
Priloga F-6: Vezikli v korenini jagod (povečava 100 x)  
Vesicles in the root of strawberry (100 x )



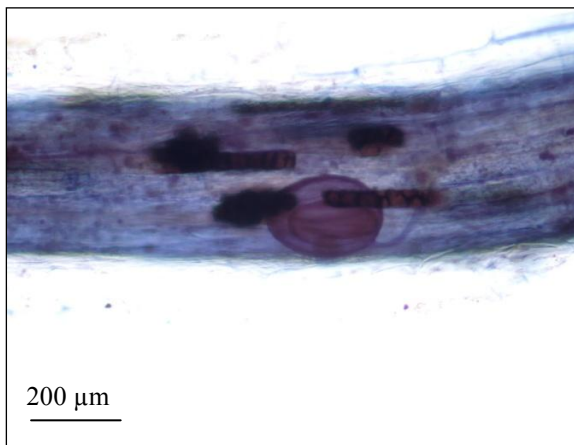
Priloga F-7: Spora mikorizne glive in arbuskuli v korenini jagode (povečava 100 x)  
Spore of arbuscular mycorrhizal fungus in the root of strawberry (100 x)

**PRILOGA G: Nemikorizna kolonizacija korenin jagod (DSE ali nepoznani koreninski endofiti)**

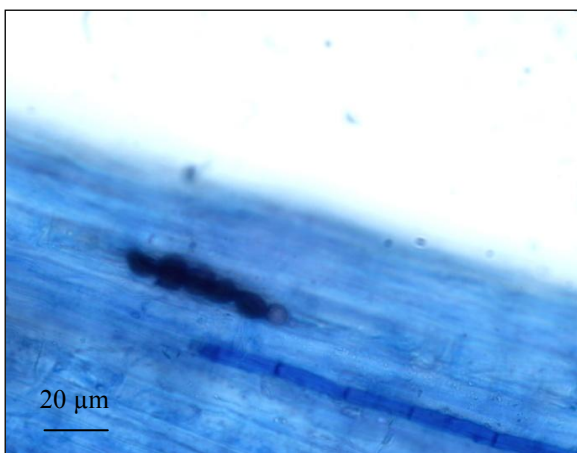
**Annex G: Nonmycorrhizal colonization of roots of strawberry (DSE or unknown root endophytes)**



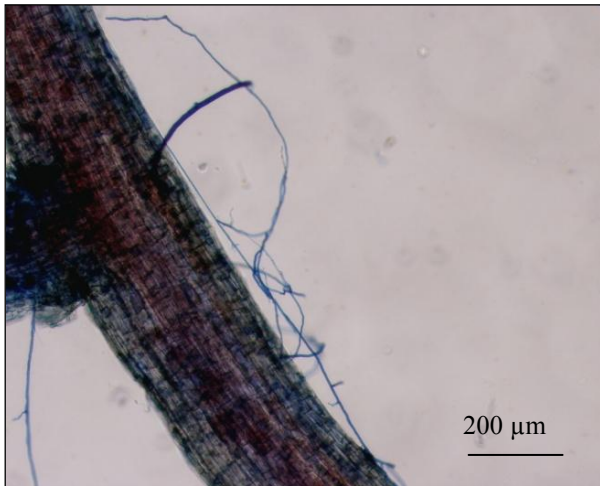
Priloga G-1: Mikrosklerociji nemikoriznih gliv – Tip 1 (povečava 400 x)  
Microsclerotia of nonmycorrhizal fungi – Type 1(400 x)



Priloga G-2: Mikrosklerociji nemikoriznih gliv – Tip 2 (povečava 100 x)  
Microsclerotia of nonmycorrhizal fungi – Type 2 (100 x)



Priloga G-3: Mikrosklerociji nemikoriznih gliv – Tip 2 in septirana hifa (povečava 1000 x)  
Microsclerotia of nonmycorrhizal fungi – Type 2 and septate hyphae



Priloga G-4: Hife mikoriznih gliv in odebeljene, zelo temno obarvane hife neznanih gliv (povečava 100 x)  
Hyphae of mycorrhizal fungi and thick, very dark colored hyphae of unknown fungi (100 x)

PRILOGA H: Masa listov in število plodov na rastlino v LP I

Annex H: Mass of leaves and number of fruits per plant in LP I

Obravnavanje		Masa listov g/rastlino		Plod Število / rastlino	
Brez MI	Bj	5,0 ± 0,3	cd	5,2 ± 0,4	bc
	Sa	9,3 ± 0,7	ab	5,9 ± 0,3	b
	Es	8,1 ± 0,5	b	4,6 ± 0,5	bcd
	SOL	3,4 ± 0,4	e	3,9 ± 0,4	bcd
	D	4,0 ± 0,7	de	0,0 ± 0,0	e
	K	3,1 ± 0,2	e	3,6 ± 0,3	cd
Z MI	Bj	5,5 ± 0,2	cd	5,8 ± 0,4	b
	Sa	10,1 ± 0,8	a	8,2 ± 1,5	a
	Es	6,1 ± 0,4	c	5,2 ± 0,5	bc
	D	5,8 ± 0,7	c	2,9 ± 1,1	d
	K	3,0 ± 0,3	e	4,0 ± 0,5	bcd
Statistična značilnost					
Obravnavanje		***		***	
MI		NS		*	

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri obravnavanjih z ali brez MI, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA I: Masa listov in število plodov na rastlino v LP II

Annex I: Mass of leaves and number of fruits per plant in LP II

Obravnavanje		Masa listov g/rastlino		Plod Število / rastlino		
brez MI	Bj	4,6 ± 0,3	bc	7,5 ± 0,5	a	
	Sa	5,5 ± 0,3	ab	7,5 ± 1,1	a	
	Es	3,8 ± 0,2	cd	5,5 ± 0,8	abcd	
	SOL	2,5 ± 0,3	ef	4,3 ± 0,5	d	
	D	3,7 ± 0,4	cd	2,3 ± 0,8	e	
	K	2,2 ± 0,3	f	4,0 ± 0,4	de	
Z MI	Bj	5,3 ± 0,4	ab	5,1 ± 0,5	bcd	
	Sa	5,4 ± 0,2	ab	7,3 ± 0,5	a	
	Es	5,6 ± 0,3	a	6,9 ± 0,7	ab	
	SOL	3,4 ± 0,4	de	4,5 ± 0,4	cd	
	D	4,1 ± 0,4	cd	4,8 ± 0,3	cd	
	K	2,3 ± 0,3	f	6,4 ± 0,8	abc	
Statistična značilnost						
Obravnavanje			***		***	
MI			***		NS	
Obravnavanje x MI			*		**	

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri obravnavanjih z ali brez MI, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA J: Povprečno število plevelov na rastlino v lončnih poskusih

Annex J: Average number of weeds per plant in pot experiments

Obravnavanje		LP I	LP II	LP III	Pleveli (LP I + LP II + LP III)		
Brez MI	Bj	6,7	10,7	2,2	6,6	± 0,4	bc
	Sa	3,7	5,7	1,4	3,6	± 0,4	d
	Es	4,9	11,6	1,7	6,1	± 0,4	bc
	SOL	8,1	8,5	1,2	5,9	± 0,3	bc
	D	0,4	0,2	0,1	0,2	± 0,1	g
	K	8,7	10,0	2,0	6,9	± 0,2	ab
Z MI	Bj	4,3	4,1		4,2	± 0,2	de
	Sa	2,2	3,1		2,6	± 0,4	e
	Es	6,3	5,3		5,8	± 0,5	bc
	SOL	/	5,5		5,5	± 0,6	c
	D	1,0	1,9		1,4	± 0,2	f
	K	9,6	6,9		8,0	± 0,7	a
Statistična značilnost							
Obravnavanje						***	
MI						NS	
Obravnavanje x MI						***	

/ ni podatka

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri obravnavanjih z ali brez MI, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA K: Povprečno število živic in listov na rastlino v poljskem poskusu

Annex K: Average number of runners and leaves per plant in the field experiment

Obravnavanje		Živice	Listi
Zeleni podor	Bj	7,7 ± 0,4 ab	20,6 ± 0,6 b
	Sa	8,3 ± 0,6 a	21,6 ± 0,9 ab
	Es	8,3 ± 0,4 a	21,2 ± 0,6 ab
	Vf	7,7 ± 0,4 ab	19,2 ± 1,0 b
Solarizacija	SOL PF 6	7,4 ± 0,4 ab	20,5 ± 0,7 b
	SOL PF 9	8,1 ± 0,6 a	19,3 ± 1,2 b
	SOL ČF 6	7,2 ± 0,4 ab	19,6 ± 1,0 b
	SOL ČF 9	6,5 ± 0,4 b	19,4 ± 1,2 b
Kemično razkuževanje	D	8,3 ± 0,5 a	23,5 ± 1,1 a
	K	7,8 ± 0,4 ab	19,3 ± 0,9 b
Statistična značilnost		NS	*

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)



PRILOGA L: Povprečno število cvetov, masa pridelka in število plodov na rastlino ter povprečna masa plodu v prvem letu poljskega poskusa (2003)

Annex L: The average number of flowers, yield and number of fruits per plant and average mass of fruit in the first year of the field experiment (2003)

Obravnavanje		Cvetenje	Pridelek	Število plodov /		Plod
		Število cvetov / rastlino	Masa plodov / rastlino	rastlino		g
Zeleni podor	Bj	67,7 ± 2,2 a	497,5 ± 8,6 ab	44,8 ± 1,8 ab	11,1 ± 0,3 a	
	Sa	70,0 ± 3,1 a	542,9 ± 21,6 a	51,5 ± 2,3 a	10,6 ± 0,1 ab	
	Es	65,1 ± 7,1 a	478,1 ± 30,2 ab	47,5 ± 2,0 ab	10,1 ± 0,2 bcd	
	Vf	69,2 ± 1,5 a	501,0 ± 32,2 ab	49,1 ± 2,3 ab	10,2 ± 0,2 bc	
Solarizacija	SOL PF 6	69,4 ± 1,5 a	465,1 ± 45,2 ab	45,5 ± 3,9 ab	10,2 ± 0,2 bc	
	SOL PF 9	66,3 ± 5,6 a	420,6 ± 15,0 b	43,3 ± 1,4 ab	9,7 ± 0,2 cd	
	SOL ČF 6	64,1 ± 1,3 a	421,5 ± 19,0 b	41,2 ± 1,2 b	10,2 ± 0,2 bc	
	SOL ČF 9	64,6 ± 3,3 a	429,2 ± 54,6 b	45,3 ± 5,0 ab	9,4 ± 0,3 d	
Kemično razkuževanje	D	72,1 ± 1,9 a	492,7 ± 9,5 ab	48,8 ± 1,8 ab	10,1 ± 0,2 bcd	
	K	62,3 ± 4,5 a	503,5 ± 46,8 ab	45,5 ± 3,2 ab	11,0 ± 0,3 a	
Statistična značilnost		NS	NS	NS	***	

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA M: Povprečna masa pridelka v drugem letu poljskega poskusa (2004)

(g/rastlino)

Annex M: The average yield in the second fruiting season in the field experiment (2004)

(g/plant)

Obravnavanje		Masa pridelka (g / rastlino)	
Zeleni podor	Bj	853,2 ± 150,3	a
	Sa	858,0 ± 210,6	a
	Es	835,8 ± 31,9	ab
	Vf	903,9 ± 142,3	a
Solarizacija	SOL PF 6	829,9 ± 43,7	ab
	SOL PF 9	853,8 ± 85,7	a
	SOL ČF 6	642,3 ± 193,2	bc
	SOL ČF 9	765,3 ± 76,7	abc
Kemično razkuževanje	D	602,3 ± 160,2	c
	K	801,3 ± 123,6	abc
Statistična značilnost			NS

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA N: Število plevelov na sadilno mesto v poljskem poskusu

Annex N: The number of weeds in the planting site in the field experiment

Obravnavanje	Število plevelov/sadilno mesto		
Bj	12,0	± 0,9	ab
Sa	9,4	± 2,1	abc
Es	11,5	± 1,8	ab
Vf	13,3	± 2,3	a
SOL PF 6	8,2	± 0,9	abc
SOL PF 9	6,9	± 0,3	bc
SOL ČF 6	9,4	± 0,9	abc
SOL ČF 9	8,7	± 1,0	abc
D	5,3	± 0,5	c
K	9,1	± 2,5	abc
Statistična značilnost	***		

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \* $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA O: Mikorizna kolonizacija korenin jagod v LP I (%)

Annex O: Mycorrhizal colonization of strawberry roots in LP I (%)

Obravnavanje		F%		M%		m%		A%		a%	
Brez MI	Bj	94,0 ± 2,1	ab	17,8 ± 2,6	abc	18,7 ± 2,5	abc	10,3 ± 2,1	ab	55,6 ± 5,2	a
	Sa	96,0 ± 1,4	a	24,4 ± 2,5	a	25,3 ± 2,4	a	12,9 ± 2,7	a	51,5 ± 6,8	a
	Es	92,7 ± 2,7	ab	16,5 ± 2,0	bc	17,4 ± 1,7	bc	4,0 ± 1,1	cd	23,4 ± 4,6	d
	SOL	88,1 ± 4,8	ab	15,0 ± 3,0	bc	16,4 ± 2,9	bc	5,4 ± 1,5	bcd	33,9 ± 8,0	bcd
	D	2,0 ± 0,7	d	0,0 ± 0,0	d	0,5 ± 0,2	d	0,0 ± 0,0	d	0,0 ± 0,0	e
	K	82,3 ± 4,5	abc	10,7 ± 2,0	c	12,4 ± 2,0	c	5,5 ± 1,4	bcd	49,7 ± 5,6	ab
Z MI	Bj	83,7 ± 3,9	abc	9,6 ± 2,6	c	10,8 ± 2,7	c	2,9 ± 0,7	cd	29,2 ± 4,5	d
	Sa	85,4 ± 5,0	abc	19,8 ± 3,9	ab	21,8 ± 3,6	ab	8,5 ± 3,4	abc	32,6 ± 7,9	cd
	Es	82,3 ± 5,6	bc	10,2 ± 3,2	c	11,1 ± 3,1	c	2,7 ± 1,5	cd	18,5 ± 4,7	d
	D	74,3 ± 5,7	c	11,6 ± 2,5	c	14,5 ± 2,7	bc	4,4 ± 1,5	cd	31,7 ± 5,2	cd
	K	85,0 ± 3,4	abc	14,5 ± 2,0	bc	16,6 ± 1,9	bc	7,3 ± 1,3	bc	48,1 ± 2,8	abc
Statistična značilnost											
Obravnavanje		***		***		***		**		***	
MI		*		NS		NS		NS		NS	

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri obravnavanjih z ali brez MI, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA P: Mikorizna kolonizacija korenin jagod v LP II (%)

Annex P: Mycorrhizal colonization of strawberry roots in LP II (%)

Obravnavanje		F%	M%	m%		A%		a%	
Brez MI	Bj	59,0 ± 9,6 c	3,5 ± 1,6 ef	4,4 ± 1,4 fg	2,3 ± 1,2 de	46,6 ± 6,5 bcd			
	Sa	47,3 ± 4,9 c	3,5 ± 1,1 ef	6,4 ± 1,4 def	1,9 ± 0,7 de	41,8 ± 7,8 cd			
	Es	80,3 ± 5,0 ab	4,4 ± 1,0 def	5,1 ± 1,1 efg	3,3 ± 0,9 cde	66,2 ± 6,1 ab			
	SOL	52,1 ± 10,4 c	6,2 ± 2,1 de	8,4 ± 2,2 cdef	4,8 ± 1,9 bcd	48,9 ± 11,5 bcd			
	D	1,3 ± 0,5 d	0,0 ± 0,0 f	0,4 ± 0,2 g	0,0 ± 0,0 e	0,0 ± 0,0 e			
	K	84,3 ± 5,4 ab	9,5 ± 1,6 bcd	11,0 ± 1,9 bcd	7,6 ± 1,5 abc	74,9 ± 4,6 a			
Z MI	Bj	97,3 ± 1,1 a	21,1 ± 2,4 a	21,6 ± 2,4 a	11,7 ± 2,3 a	53,1 ± 5,8 bc			
	Sa	89,3 ± 3,5 ab	7,4 ± 1,5 cde	8,1 ± 1,5 cdef	2,2 ± 0,8 de	29,3 ± 6,8 d			
	Es	88,0 ± 3,5 ab	14,2 ± 2,7 b	15,7 ± 2,6 b	7,3 ± 1,8 abc	47,0 ± 5,9 bcd			
	SOL	84,7 ± 3,8 ab	11,9 ± 2,6 bc	13,2 ± 2,4 bc	7,9 ± 2,3 abc	62,8 ± 5,8 abc			
	D	75,6 ± 4,7 b	8,1 ± 1,2 cde	10,4 ± 1,2 bcde	5,0 ± 1,2 bcd	61,1 ± 8,3 abc			
	K	86,0 ± 4,1 ab	13,9 ± 1,9 b	15,7 ± 1,7 b	8,8 ± 1,7 ab	61,0 ± 6,1 abc			
Statistična značilnost									
Obravnavanje		***	***	***	***	***	***	***	***
MI		***	***	***	***	***	***	NS	NS
Obravnavanje x MI		***	**	**	*	***	*	***	***

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri obravnavanjih z ali brez MI, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ;  $*0,05 \geq p \geq 0,01$ ,  $**0,01 \geq p \geq 0,001$ ,  $***0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA R: Mikorizna kolonizacija jagod v LP III (%)

Annex R: Mycorrhizal colonization of strawberry roots in LP III (%)

Obravnavanje	F%	M%	m%	A%	a%
Bj	20,7 ± 5,1 ab	0,8 ± 0,3 a	3,3 ± 0,9 ab	0,05 ± 0,04 a	2,9 ± 2,1 b
Sa	16,7 ± 6,2 abc	0,6 ± 1,1 a	2,8 ± 1,6 ab	0,02 ± 0,02 a	0,3 ± 0,2 b
Es	27,3 ± 5,5 a	1,5 ± 0,6 a	4,1 ± 1,1 a	0,23 ± 0,12 a	9,0 ± 2,4 a
SOL	9,0 ± 1,9 bc	0,1 ± 0,0 a	1,3 ± 0,2 ab	0,00 ± 0,00 b	1,3 ± 0,9 b
D	5,3 ± 2,5 c	0,1 ± 0,0 a	0,6 ± 0,2 b	0,00 ± 0,00 a	0,0 ± 0,0 b
K	12,6 ± 4,9 bc	0,4 ± 0,7 a	3,3 ± 1,4 ab	0,02 ± 0,02 a	4,5 ± 0,8 ab
Statistična značilnost	*	NS	NS	*	NS

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, pri obravnavanjih z ali brez MI, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test)

NS  $p > 0,05$ ; \*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ , \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ , \*\*\*  $0,001 \geq p$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; SOL = solarizacija; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA S: Mikorizna kolonizacija ter delež nemikoriznih mikrosklerocijev v vzorcih za molekularno identifikacijo I (10 mesecev po sajenju) (%)

Annex S: Mycorrhizal colonization and share of nonmycorrhizal fungal structures in the samples for the molecular identification I (10 months after planting) (%)

Št. vzorca	Oznaka vzorca	F%*	M%	m%	A%	a%	Vezikli**	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	Tip 6
1	Es+MI 1	100	20,5	20,5	0,0	0,1	23,3	26,6	6,6	0,0	0,0	0,0
2	Sa+MI 6	86,7	33,1	38,2	0,2	0,6	16,7	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0
3	Es 6	36,7	1,5	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7
4	Es 10	93,3	18,6	19,9	0,7	3,7	16,7	0,0	10,0	30,0	66,7	0,0
5	K 2	93,3	11,8	12,6	7,1	60,4	/***	/	/	/	/	/
6	K 10	93,1	8,0	8,6	1,7	21,1	52,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	K 13	96,7	14,4	14,9	12,6	87,4	/	/	/	/	/	/
8	Σ K (2+10+13)											

\*mikorizna kolonizacija po Trouvelotu (F%, M%, m%, A% , a% )

\*\*delež veziklov in nemikoriznih mikrosklerocijev = delež koreninic z mikrosklerociji v vzorcu 30. delov koreninic

\*\*\*/- meritve niso bile opravljene

PRILOGA T: Mikorizna kolonizacija ter delež nemikoriznih mikrosklerocijev v vzorcih za molekularno identifikacijo II (%)

Annex T: Mycorrhizal colonization and share of nonmycorrhizal fungal structures in the samples for the molecular identification II (%)

	F%*	M%	m%	A%	a%	Vezikli**	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	Tip 6
1 Bj 1	66,67	0,93	1,40	0,01	1,07	0,0	0,0	3,3	0,0	6,7	0,0
2 Es 6	80,00	1,07	1,33	0,01	0,62	0,0	0,0	10,0	0,0	16,7	0,0
3 Bj 5	40,00	0,40	1,00	0,04	10,00	0,0	20,0	6,6	0,0	3,3	6,6
4 Sa 4	83,33	4,67	5,60	0,22	4,64	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5 SOL 7	83,33	1,50	1,80	0,03	2,00	0,0	10,0	3,3	0,0	0,0	0,0
6 K 2	63,30	1,57	2,47	0,08	5,11	0,0	0,0	0,0	3,3	40,0	0,0
7 Es 8	40,00	0,40	1,00	0,00	0,83	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8 Sa 6	46,67	1,00	2,14	0,19	19,33	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
9 Es + MI 1	100,00	20,47	20,47	0,02	0,08	23,3	26,6	6,6	0,0	0,0	0,0
10 Sa + MI 6	86,67	33,10	38,19	0,20	0,61	16,7	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0
11 Es 6	36,67	1,47	4,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7
12 Es 10	93,30	18,57	19,89	0,69	3,70	16,7	0,0	10,0	30,0	66,7	0,0

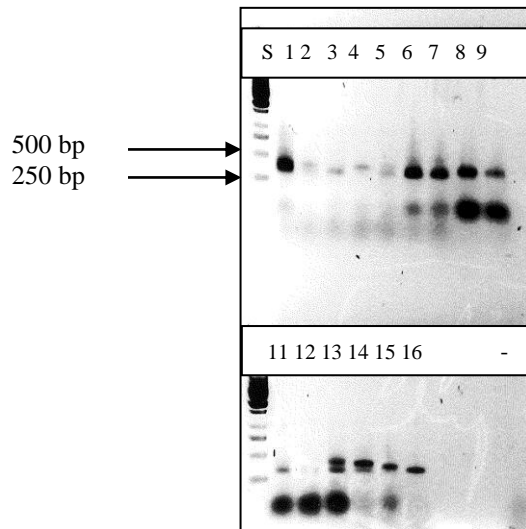
\*mikorizna kolonizacija po Trouvelotu (F%, M%, m%, A% , a% )

\*\*delež veziklov in nemikoriznih mikrosklerocijev = delež koreninic z mikrosklerociji v vzorcu 30. delov koreninic



PRILOGA U: Produkti PCR (ITS 4 in ITS 3)

Annex U: PCR products (ITS 4 and ITS 3)



PCR produkti fragmentov iz TTGE; Vzorci od 1 do 16; S - standard (lestvica 1kb); – negativna kontrola  
PCR products from TTGE fragments; Samples from 1 to 16, S - standard (scale 1KB) - negative control

PRILOGA V: Mikorizna kolonizacija korenin jagod v poljskem poskusu (leto sajenja 2002) (%)

Annex V: Mycorrhizal colonization of roots of strawberry in the field experiment (planting year 2002) (%)

Obravnavanje		F%	M%	m%	A%	a%					
Zeleni podor	Bj	43,7 ± 4,6	ab	3,3 ± 1,1	a	7,6 ± 1,6	a	0,6 ± 0,4	ab	11,6 ± 3,0	a
	Sa	45,9 ± 5,0	ab	5,6 ± 1,2	a	9,4 ± 1,7	a	1,2 ± 0,4	ab	15,8 ± 3,3	a
	Es	49,8 ± 4,9	ab	4,5 ± 1,1	a	6,8 ± 1,7	a	1,6 ± 0,4	a	14,8 ± 3,2	a
	Vf	37,0 ± 4,7	b	3,0 ± 1,1	a	5,8 ± 1,6	a	0,6 ± 0,4	ab	14,3 ± 3,1	a
Solarizacija	SOL PF 6	47,4 ± 4,9	ab	4,9 ± 1,1	a	9,4 ± 1,7	a	0,6 ± 0,4	ab	9,7 ± 3,2	a
	SOL PF 9	42,0 ± 5,0	ab	5,5 ± 1,1	a	10,1 ± 1,7	a	0,6 ± 0,4	ab	10,0 ± 3,2	a
	SOL ČF 6	55,5 ± 4,8	a	5,4 ± 1,1	a	8,5 ± 1,6	a	0,7 ± 0,4	ab	8,8 ± 3,1	a
	SOL ČF 9	53,1 ± 5,0	a	5,6 ± 1,1	a	9,3 ± 1,7	a	0,2 ± 0,4	b	5,7 ± 3,3	a
Kemično razkuževanje	D	50,8 ± 4,8	ab	5,4 ± 1,1	a	9,2 ± 1,6	a	0,8 ± 0,4	ab	12,4 ± 3,1	a
	K	49,7 ± 5,0	ab	5,3 ± 1,1	a	8,6 ± 1,7	a	1,1 ± 0,4	ab	14,7 ± 3,3	a
Statistična značilnost		NS		NS		NS		NS		NS	

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) NS  $p > 0,05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)

PRILOGA Z: Delež rastlin z vezikli in mikrosklerociji DSE oz. neznanimi koreninskimi edofiti v vzorcu posameznega obravnavanja v poljskem poskusu (%)

Annex Z: The proportion of plants with vesicles and structures of DSE or unknown root endophytes in each treatment of the field experiment (%)

Obravnavanje		Vezikli %	DSE * %
Zeleni podor	Bj	49,2 ± 10,9 ab	10,4 ± 50,8 ab
	Sa	30,0 ± 20,8 ab	3,3 ± 3,3 b
	Es	40,0 ± 10,0 ab	16,7 ± 3,3 ab
	Vf	22,9 ± 11,9 b	3,3 ± 3,3 b
Solarizacija	SOL PF 6	80,0 ± 20,0 a	45,8 ± 29,2 a
	SOL PF 9	52,5 ± 20,7 ab	18,0 ± 12,9 ab
	SOL ČF 6	30,0 ± 15,3 ab	25,6 ± 12,4 ab
	SOL ČF 9	36,7 ± 18,6 ab	6,7 ± 6,7 ab
Kemično razkuževanje	D	50,0 ± 11,6 ab	36,7 ± 8,8 ab
	K	43,8 ± 17,0 ab	4,8 ± 4,8 b
Statistična značilnost		NS	NS

\*DSE in nepoznani koreninski endofiti

(Povprečna vrednost ± SN). Vrednosti, označene z različnimi črkami, se statistično razlikujejo pri  $p < 0,05$  (ANOVA, Duncanov test) NS  $p > 0,05$

(Bj = *Brassica juncea*; Sa = *Sinapis alba*; Es = *Eruca sativa*; Vf = *Vicia faba* var. *minor*; SOL PF 6 = solarizacija - prozorna folija - 6 tednov; SOL PF 9 = solarizacija - prozorna folija - 9 tednov; SOL ČF 6 = solarizacija - črna folija - 6 tednov; SOL ČF 9 = solarizacija - črna folija - 9 tednov; D = dazomet; K = kontrola)