

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nataša ŠIBANC

**BIODIVERZITETA ARBUSKULARNIH MIKORIZNIH
GLIV IN IZBRANIH SKUPIN RIZOSFERNIH
MIKROORGANIZMOV NA NARAVNIH IZVIRIH CO₂**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Nataša ŠIBANC

**BIODIVERZITETA ARBUSKULARNIH MIKORIZNIH GLIV IN IZBRANIH
SKUPIN RIZOSFERNIH MIKROORGANIZMOV NA NARAVNIH IZVIRIH CO₂**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**BIODIVERSITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND SELECTED
GROUPS OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS FROM NATURAL CO₂
SPRINGS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani, po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 23. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 7. 12. 2011 je bila dne 26. 1. 2012 izdana odločba, ki potrjuje, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti s področja biologije. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Irena Maček.

Laboratorijski del in analiza podatkov ocene kolonizacije korenin z arbuskularnimi mikoriznimi (AM) glivami, izolacija korenin iz talnih vzorcev ter vsa statistična obdelava podatkov vključno z bioinformatiko podatkov za preučevanje biodiverzitete AM gliv je bila izvedena na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko, Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Laboratorijski del molekularskih analiz koreninskih vzorcev za preučevanje biodiverzitete AM gliv je bil izveden na Oddelku za biologijo, Univerze v Yorku (Velika Britanija), laboratorijski del molekularskih analiz za preučevanje biodiverzitete arhej in bakterij je bil izveden na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in laboratorijski del analiz za preučevanje biodiverzitete kvasovk v Skupini za biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: prof. dr. Nina GUNDE - CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: doc. dr. Irena MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Članica: izr. prof. dr. Elena VARLJEN BUŽAN
Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Oddelek za biodiverzitetu

Datum zagovora: 4. 4. 2014

Priložena doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Nataša ŠIBANC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
 DK UDK 574.1:631.466 (043.3)=163.6
 KG biodiverzitetata/povečana koncentracija CO₂/naravni izviri CO₂/arbuskularna mikoriza/arheje/bakterije/kvasovke
 AV ŠIBANC, Nataša, univ. dipl. ing. agr.
 SA MAČEK, Irena (mentorica)
 KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, smer biologija
 LI 2014
 IN BIODIVERZITETA ARBUSKULARNIH MIKORIZNIH GLIV IN IZBRANIH SKUPIN RIZOSFERNIH MIKROORGANIZMOV NA NARAVNIH IZVIRIH CO₂
 TD Doktorska disertacija
 OP XX, 166, [1] str., 23 pregl., 32 sl., 202 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Razumevanje procesov, ki vplivajo na diverzitetu združb talnih mikroorganizmov, ima pomembno vlogo pri napovedi odzivov ekosistemov in njihovih funkcij na okoljske spremembe. Tovrstne raziskave so v naravnih ekosistemih težavne zaradi specifičnih lastnosti tal, saj so selekcijski pritiski v tleh redko časovno in prostorsko usmerjeni in se pogosto prekrivajo z drugimi talnimi karakteristikami. Naravni izviri CO₂ (mofete) so ekstremni ekosistemi, kjer ogljikov dioksid (CO₂) geološkega izvora doseže površino tal in povzroča dolgoročne spremembe v sestavi talnega zraka. Ker se CO₂ prezračuje skozi tla, najprej prizadene korenine rastlin in talne organizme. Za naše raziskave diverzitetate in ekologije združb talnih mikroorganizmov smo izbrali vrstno pestre in funkcionalno pomembne skupine mikrobov; arbuskularne mikorizne (AM) glive, arheje, bakterije in kvasovke. Sestavo združb AM gliv smo na območjih izbranih lokacij mofet v Sloveniji, Italiji in Republiki Češki določili z metodo pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche), sestavo združb arhej in bakterij smo določili na območju slovenskih mofet v okolici Stavešincev s konvencionalnim pristopom na podlagi PCR, kloniranja in sekvenciranja po Sangerju. Kvasovke smo na območju slovenskih mofet izolirali z uporabo več različnih tehnik izolacije in različnih gojišč ter identificirali z molekulskimi pristopi. Najpomembnejši okoljski dejavniki, ki vplivajo na sestavo združb AM gliv, arhej in bakterij na območjih naravnih izvirov CO₂, so koncentracija CO₂ v talnem zraku, hipoksija in pH tal. Dodatno smo ugotovili, da na variabilnost v sestavi združb AM gliv vplivajo tudi razlike med leti vzorčenja, medtem ko razlik med različnimi meseci vzorčenja in vpliva geografske oddaljenosti med mofetami nismo opazili. V združbi AM gliv smo ugotovili večjo biodiverzitetate (glede na izračunana Hillova števila) na kontrolnih območjih, medtem ko razlik v biodiverziteti med združbami arhej in bakterij na območjih z različno koncentracijo CO₂ nismo opazili. Identificirali smo osem izolatov kvasovk, med njimi tudi kvasovko *Occultifur species sp. nov.*, ki velja za novo, do sedaj še neopisano vrsto. Rezultati naše študije kažejo, da ima lahko izhajanje geološkega plina pomembne ekološke posledice, ki nastanejo zaradi sprememb v sestavi združb talnih mikroorganizmov. Te se dogajajo v smeri večje abundance anaerobnih in metanogenih predstavnikov arhej in bakterij, večje številčnosti fermentativnih kvasovk in trajnih sprememb v sestavi združb vseh raziskovanih mikrobnih skupin v smeri večje abundance ekoloških specialistov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
 DC UDC 574.1:631.466 (043.3)=163.6
 CX biodiversity/elevated CO₂ concentration/natural CO₂ springs/arbuscular mycorrhiza/archaea/bacteria/yeast
 CC AGRIS
 AU ŠIBANC, Nataša, BSc
 AA MAČEK, Irena (supervisor)
 PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Biology
 PY 2014
 TI BIODIVERSITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND SELECTED GROUPS OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS FROM NATURAL CO₂ SPRINGS
 DT Doctoral Dissertation
 NO XX, 166, [1] p., 23 tab., 32 fig., 202 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Understanding the processes that regulate the diversity of soil microorganisms is essential for predicting ecosystem responses to environmental changes. Research in natural ecosystems is difficult to conduct due to the specific characteristics of soil, where selection pressures in soils are rarely temporally and spatially oriented and often tend to overlap with other soil characteristics. Natural CO₂ springs (mofettes) are extreme ecosystems, where carbon dioxide (CO₂) of geological origin reaches the soil surface resulting in long term changes in soil gas composition. Because CO₂ vents through the soil, plant roots and soil organisms are the first to be affected by this CO₂ source. For this study on diversity and ecology of communities of soil microorganisms, species-rich and functionally important groups of soil microbes; arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, archaea, bacteria, and yeasts were chosen. The AM fungal community composition from selected mofette areas in Slovenia, Italy and the Czech Republic, was determined using Roche 454 GS-FLX pyrosequencing. The community composition of archaea and bacteria from the area of Slovenian mofettes near Stavešinci village was determined using PCR, cloning and Sanger sequencing. Yeasts from the area of Slovenian mofettes were isolated using several isolation techniques and different growth media and identified using molecular approaches. The most important environmental factors influencing AM fungal, archaeal, and bacterial community composition from natural CO₂ springs are the concentration of CO₂ in soil air, hypoxia and soil pH. In addition, we have found that AM fungal community composition was different between the two years of sampling, but no significant compositional changes in AM fungal community were observed among different months, or among geographically distant mofettes. AM fungal communities sampled from control locations showed higher biodiversity (according to Hill's numbers) while no significant difference in biodiversity of archaea and bacteria among locations with different CO₂ concentrations was observed. We have identified eight yeast isolates, including the yeast *Occultifur* species sp. nov., a new, previously undescribed species. The results of our study show that the emission of geological gas can have significant ecological consequences arising from the changes in the soil microbial community composition. This is shown by a shift towards a greater abundance of anaerobic and methanogenic archaea and bacteria and higher number of fermentative yeast species and also a permanent changes in community composition of all researched microbial groups towards a greater abundance of ecological specialists.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	Str. III
	Key words documentation (KWD)	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	X
	Kazalo slik	XIV
	Okrajšave	XIX
	Terminološki slovarček	XX
1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	NARAVNI IZVIRI CO ₂	4
2.1.1	Pomen raziskav na naravnih izviri CO₂	5
2.1	BIODIVERZITETA MIKROBNIH ZDRUŽB	6
2.1.1	Problematika molekulske karakterizacije mikrobnih združb	7
2.2	TALNI MIKROORGANIZMI NA OBMOČJIH MOFET	10
2.2.1	Arbuskularne mikorizne glive (deblo Glomeromycota)	12
2.2.1.1	Arbuskularna mikoriza	12
2.2.1.2	Molekulska identifikacija AM gliv	13
2.2.1.3	Diverzitetna in sestava združb AM gliv	15
2.2.1.4	Biogeografija AM gliv	18
2.2.1.5	Raziskave arbuskularne mikorize na območjih mofet	19
2.2.2	Arheje in bakterije	20
2.2.3	Kvasovke	21
2.2.3.1	Identifikacija kvasovk z območja mofet	23
3	MATERIAL IN METODE	25
3.1	MERITVE KONCENTRACIJE TALNIH PLINOV IN PEDOLOŠKA ANALIZA TAL	29
3.2	OPIS LOKACIJ VZORČENJA	30

3.2.1	Travniški izviri CO₂ v okolici Stavešincev (travniške mofete)	30
3.2.2	Gozdni izviri CO₂ na Stavešinskem vrhu (gozdne mofete)	31
3.2.3	Naravni izviri CO₂ na Češkem (češke mofete)	32
3.2.4	Naravni izviri CO₂ Bossoleto v Italiji (italijanske mofete)	34
3.3	ARBUSKULARNE MIKORIZNE GLIVE	36
3.3.1	Vzorčenje korenin	36
3.3.1.1	Travniške mofete v okolici Stavešincev	36
3.3.1.2	Gozdne mofete na Stavešinskem vrhu	37
3.3.1.3	Češke mofete	37
3.3.1.4	Italijanske mofete	38
3.3.2	Ocenjevanje mikorizne kolonizacije v koreninah rastlin	38
3.3.2.1	Statistična obdelava podatkov	41
3.3.3	Molekulska analiza združb AM gliv v koreninah vzorčenih rastlin	41
3.3.3.1	Ekstrakcija DNK	41
3.3.3.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	41
3.3.3.3	Pirosekvenciranje s pomnoževanjem na kroglicah (454 GS-FLX, Roche)	43
3.3.4	Bioinformatika in statistična obdelava podatkov	45
3.4	ARHEJE IN BAKTERIJE	49
3.4.1	Vzorčenje tal	49
3.4.2	Molekulska analiza arhejskih in bakterijskih združb	49
3.4.2.1	Izolacija DNK	49
3.4.2.2	Dolžinski polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)	49
3.4.2.3	Priprava knjižnic genov 16S rRNK	51
3.4.3	Bioinformatika in statistična obdelava podatkov	52
3.5	KVASOVKE	54
3.5.1	Vzorčenje tal	54
3.5.2	Izolacija kvasovk	54
3.5.3	Molekulska identifikacija kvasovk	58
3.5.3.1	PCR protokol za gene rRNK za LSU	59
3.5.4	Fermentacijski testi	59
3.5.5	Asimilacijski testi za kvasovke	60
3.5.6	Tvorba škroba	62

3.5.7	Ugotavljanje ureazne aktivnosti sevov <i>Occultifur species sp. nov.</i>	62
3.5.8	Parjenje in sporulacija <i>Occultifur species sp. nov.</i>	62
3.5.9	Velikost posameznih celic <i>Occultifur species sp. nov.</i>	63
3.5.10	Bioinformatika	63
4	REZULTATI	64
4.1	ABIOTSKI DEJAVNIKI OKOLJA	64
4.1.1	Okoljski podatki, uporabljeni za raziskave združb AM gliv	64
4.1.2	Okoljski podatki, uporabljeni za raziskave združb arhej in bakterij	72
4.1.3	Okoljski podatki, uporabljeni za raziskave biodiverzitet kvasovke	73
4.2	RAZISKAVE KOLONIZACIJE KORENIN, SESTAVE ZDRUŽB IN DIVERZITETE AM GLIV NA OBMOČJIH MOFET	74
4.2.1	Kolonizacija korenin rastlin z AM glivami	74
4.2.2	Sestava združb AM gliv	75
4.2.2.1	Krivulje redčenja vrst in krivulje kopičenja vrst za podatke iz območja travniških mofet	75
4.2.2.2	Sestava združb AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev	82
4.2.2.3	Sestava združb AM gliv na mofetah na večji prostorski skali	84
4.2.2.4	Diverziteti AM gliv na območjih mofet	86
4.2.2.5	Kvantifikacijski parametri v sestavi združb AM gliv na območjih mofet	88
4.2.2.6	Filogenetska sestava združb AM gliv na območju travniških mofet	91
4.3	RAZISKAVE SESTAVE ZDRUŽB IN DIVERZITETE ARHEJ IN BAKTERIJ NA OBMOČJIH MOFET	94
4.3.1	Profili mikrobnih združb	94
4.3.2	Genska klonska knjižnica 16S rRNK	96
4.3.2.1	Krivulje redčenja vrst	96
4.3.2.2	Ordinacijski prikaz razlik v sestavi združb arhej in bakterij	98
4.3.2.3	Diverzitetni indeksi	100
4.3.2.4	Filogenetska sestava združb arhej in bakterij	100
4.4	RAZISKAVE BIODIVERZITETE KVASOVK NA OBMOČJU MOFET	109
4.4.1	Biodiverziteti kvasovk	109
4.4.2	Fermentacija	110

4.4.3	Kvasovka <i>Occultifur species sp. nov.</i>	112
4.4.3.1	Fermentacija, aktivnost ureaze in sinteza škroba	112
4.4.3.2	Asimilacijski testi	112
4.4.3.3	Parjenje	116
4.4.3.4	Velikost celic	116
4.4.3.5	<i>Occultifur species sp. nov.</i> in najbližji sorodniki	117
4.4.4	Testiranje rasti anaerobnih in fakultativno anaerobnih kvasovk v atmosferi CO₂	118
5	RAZPRAVA	120
5.1	ARBUSKULARNE MIKORIZNE GLIVE	120
5.1.1	Kolonizacija rastlinskih korenin z AM glivami	120
5.1.2	Vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv	122
5.1.3	Alfa diverziteta AM gliv na območjih mofet	128
5.1.4	Filogenetska sestava združb AM gliv na območjih mofet	130
5.2	ARHEJE IN BAKTERIJE	132
5.2.1	Vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb arhej in bakterij	132
5.2.2	Alfa diverziteta združb arhej in bakterij na območjih mofet	133
5.2.3	Filogenija združb arhej in bakterij na območjih mofet	134
5.2.3.1	Arheje	134
5.2.3.2	Bakterije	135
5.3	KVASOVKE	136
5.3.1	Sposobnost preživetja kvasovk v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ in fermentacija glukoze	136
5.3.2	Filogenija kvasovk	137
6	SKLEPI	139
7	POVZETEK (SUMMARY)	142
7.1	POVZETEK	142
7.2	SUMMARY	145
8	VIRI	148

ZAHVALA

PRILOGA A

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1. Regije uporabe posameznega molekulskega označevalca oz. gena za ločevanje taksonov na različnih ravneh (povzeto po Kranjec, 2008).	8
Pregl. 2. Seznam študij s področja raziskav mikrobiologije in biodiverzitete talnih mikroorganizmov na območjih mofet (povzeto po Maček, 2013).	10
Pregl. 3. Pregled uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje arhejskih in bakterijskih genov 16S rRNK.	51
Pregl. 4. Sestava gojišč YMA, ki smo jih uporabili pri izolaciji kvasovk.	57
Pregl. 5. Pregled izolacijskih tehnik, uporabljenih za izolacijo kvasovk	58
Pregl. 6. Viri dušika, uporabljenega pri asimilacijskih testih.	61
Pregl. 7. Podatki o lastnostih tal travniške mofete v okolici Stavešincev, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO ₂ , uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na biodiverzitetu AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P ₂ O ₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO ₂) in % (v/v) kisika (O ₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 4$). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO ₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test).	65
Pregl. 8. Vremenski podatki za mofete v okolici Stavešincev, pridobljeni iz vremenske postaje Gornja Radgona, uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na biodiverzitetu AM gliv. Prikazana so povprečja (\pm SO) za 30-dnevno obdobje, ločeno za maksimalno T, minimalno T in sončno obsevanje, ki se zaključijo na zadnji dan vsakega vzorčenja (4. 5., 30. 6., 18. 8., 29. 10. 2010 in 20. 4., 29. 6., 26. 8., 26. 10. 2011), in skupna količina padavin za to 30 dnevno obdobje.	66
Pregl. 9. Popis rastlin iz talnih izvrtkov, vzorčenih na travniški mofeti. Rastline, ki so se pojavile samo na enem izmed območij (visok CO ₂ ali kontrola), so označene z odebeljenim besedilom.	67

Pregl. 10. Podatki o lastnostih tal gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na biodiverziteto AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 4$). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test). 69

Pregl. 11. Podatki o lastnostih tal čeških mofet, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na biodiverziteto AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 6$ ponovitev za kontrolna območja in $n = 8$ ponovitev za območja z visoko koncentracijo CO₂). Statistično značilne razlike med vrednostmi z območij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test). 70

Pregl. 12. Podatki o lastnostih tal na območju italijanskih mofet, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N) in tok ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ogljikovega dioksida (CO₂). Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon (visok CO₂: $n = 3$ pri talnih vzorcih rizosfere *Agrostis stolonifera*, $n = 4$ za *Phragmites australis*, $n = 4$ za *Plantago lanceolata*, $n = 3$ za *Centaurea alba*; kontrolno območje: $n = 4$ za *Agrostis stolonifera*, $n = 2$ za *Phragmites australis*, $n = 3$ za *Plantago lanceolata*, $n = 3$ za *Centaurea alba*). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test). 71

Pregl. 13. Podatki o lastnostih tal na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, izpostavljenih visoki, srednji in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb arhej in bakterij: prikazani so % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in kisika (O₂) v zraku, pH tal, razpoložljivi

- fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N) in zadrževalna kapaciteta tal (WHC). Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon. Povprečne vrednosti v isti vrstici brez enake skupne črkovne oznake (a, b, c) so med seboj statistično različne ($P < 0,05$; test mnogoterih primerjav Tukeyevi kontrasti). 72
- Pregl. 14. Podatki o lastnostih tal na območju travniške mofete v okolici Stavešincev za mesec junij 2010, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljenih pri analizi biodiverzitete kvasovk: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 4$). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test). 73
- Pregl. 15. Ocena kolonizacije korenin rastlin z AM glivami. V kolonizaciji korenin ni bilo statistično značilnih razlik med rastlinami z območij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ ($P > 0,05$; Kruskal-Wallisov test). 74
- Pregl. 16. Sekvence AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnih območij, glede na bazo MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>). 91
- Pregl. 17. Sekvence 16S rRNK arhej iz območja z visoko in srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnega območja. Statistično značilna razlika v relativni abundanci taksonov je označena odebeljeno ($P < 0,05$). Nadpisane črke označujejo rezultate testov Tukeyevih kontrastov. 101
- Pregl. 18. Sekvence 16S rRNK bakterij z območij z visoko in srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnega območja. Statistično značilna razlika v relativni abundanci taksonov je prikazana z odebeljenim besedilom ($P < 0,05$). Nadpisane črke označujejo rezultate testa mnogoterih primerjav (Tukey). 104
- Pregl. 19. Pregled izolatov kvasovk iz tal travniških mofet v okolici Stavešincev ter pregled uporabljenih izolacijskih metod, rezultatov fermentacijskih testov, sposobnosti rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ ter terminov vzorčenja tal za izolacijo kvasovk. 111

- Pregl. 20. Asimilacijski in fermentacijski testi ter test sinteze škroba dveh izolatov kvasovke *Occultifur species* sp. nov. in dveh izolatov kvasovke *Occultifur externus*. 113
- Pregl. 21. Asimilacijski testi štirih izolatov kvasovke *Occultifur species* sp. nov. 115
- Pregl. 22. Dolžina in širina posameznih celic kvasovke *Occultifur species* sp. nov. 116
- Pregl. 23. Test rasti izbranih izolatov kvasovk iz zbirke ekstremofilnih kvasovk – EXF v atmosferi CO₂ (74 ± 16 %) in atmosferi O₂ (20 %) ter po literaturi povzeta fermentacija D-glukoze (Kurtzman, 2011). 118

KAZALO SLIK

- Sl. 1. Shematski pregled kombinacij različnih začetnih oligonukleotidov, ki se uporabljajo pri raziskavah arbuskularnih mikoriznih gliv. Na vrhu slike so prikazani molekularni označevalci jedrne ribosomske RNK – mala podenota ribosoma (16-18S SSU), velika podenota ribosoma (23-28S LSU), 5.8S medgenski vmesnik (IGS) in notranji prepisani vmesnik (ITS). Trikotniki prikazujejo smer in mesto prijemanja začetnih oligonukleotidov (povzeto po Stockinger, 2010). 14
- Sl. 2. Lokacija travniških mofet v okolici Stavešincev in gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, Slovenija (vir posnetka: Google Maps). 27
- Sl. 3. Lokacije travniških, gozdnih, italijanskih in čeških mofet (vir posnetka: Google Maps). 28
- Sl. 4. Območje travniških mofet v okolici Stavešincev. Na sliki je prikazana mikrolokacija Mofeta 3, na levi strani so oznake za kontrolne lokacije z ambientalno koncentracijo CO₂, na desni strani so oznake lokacij z visoko koncentracijo CO₂. 31
- Sl. 5. Gozdne mofete na Stavešinskem vrhu. Na sliki so prikazane tudi oznake vzorčnih mest za vzorce z visoko koncentracijo CO₂. 32
- Sl. 6. Češke mofete v dolini Plesná v okolici Cheba (fotografirala I. Maček). 34
- Sl. 7. Območje italijanskih mofet Bossoleto v bližini kraja Rapolano (fotografirala I. Maček). 35
- Sl. 8. Območje travniških mofet v okolici Stavešincev. Na sliki so prikazane posamezne lokacije vzorčenja, Mofeta 1, Mofeta 2 in Mofeta 3 (vir posnetka: Google Maps). 37
- Sl. 9. Ocenjevanje mikorizne kolonizacije v koreninah. Kolonizacija korenin z arbuskularno mikorizo se na podlagi % mikorizne kolonizacije v korenini rastline razvršča v razred 0 (0 % kolonizacije), razred 1 (< 1 %), razred 2 (< 10 %), razred 3 (< 50 %), razred 4 (> 50 %) in razred 5 (> 90 %). Gostota arbuskulov se razvršča v razrede A0 (brez arbuskulov), razred A1 (malo arbuskulov), razred A2 (srednje

- veliko arbuskulov) in razred A3 (veliko arbuskulov) (povzeto po Trouvelot in sod., 1986). 39
- Sl. 10. Uporabljeni fuzijski začetni oligonukleotidi. »Forward« začetni oligonukleotid je sestavljen iz adaptorja A (prikazan z odebeljenim besedilom), ki je specifičen za reakcijo pirosekvenciranja, sledi mu 10 baznih parov dolg ločevalec MID (multiplex identifier) in »forward« začetni oligonukleotid WANDA. »Reverse« začetni oligonukleotid je sestavljen iz adaptorja B (označen z odebeljenim besedilom), ki mu sledi »reverse« začetni oligonukleotid AM1 (Dumbrell in sod., 2011). 43
- Sl. 11. Pregled postopka pirosekvenciranja 454 (<http://www.454.com>). 44
- Sl. 12. Pregled postopkov pri analizi T-RFLP (<http://www.appliedbiosystems.com>). 50
- Sl. 13. Flotacijska metoda: plasti mineralnega olja s tlemi (zgoraj), fiziološka raztopina (na sredini) in talna usedlina (na dnu). 56
- Sl. 14. Fermentacijski test. Rumena barva tekočega gojišča v epruveti prikazuje sposobnost kvasovk za fermentacijo glukoze, kar se kaže tudi v prisotnosti plina v Durhamovih cevkah. 60
- Sl. 15. Krivulja redčenja MOTU (število MOTU v odvisnosti od števila analiziranih sekvenc) posameznih vzorcev iz območja travniških mofet, z lokacijo vzorčenja, prikazano ob koncu vsake krivulje. Lokacija Travnik 1 ustreza Mofeti 1, lokacija Travnik 2 ustreza Mofeti 2 in lokacija Travnik 3 ustreza Mofeti 3, vse iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Polna linija prikazuje vzorčenje v letu 2010, prekinjena linija pa vzorčenje v letu 2011. Različne barve krivulj prikazujejo različne mesece vzorčenja, modra za aprilsko, zelena za junijsko, rdeča za avgustovsko in rumena za oktobrsko vzorčenje. MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 97 % podobnosti. 76
- Sl. 16. Krivulje kopičenja MOTU (število molekulskih operativnih taksonomskih enot – MOTU v odvisnosti od števila vzorcev) prikazujejo povprečne vrednosti števila MOTU (\pm interval zaupanja) vseh treh vzorčenih lokacij ter vzorčenj v obeh letih, prikazane ločeno za vsak mesec. Polne linije prikazujejo krivulje kopičenja,

prekinjene linije prikazujejo intervale zaupanja. Črna barva krivulj označuje območje z visoko koncentracijo CO₂, siva barva krivulj označuje kontrolno območje. MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 97 % podobnosti. 79

Sl. 18. Ordinacija CCA (kanonična korespondenčna analiza) združb AM gliv iz območja travniških mofet, kjer CCA os 1 pojasni 46,19 % variabilnosti znotraj združb AM gliv, in CCA os 2 pojasni 22,10 % variabilnosti. Na grafu (a) točke predstavljajo združbo AM gliv na posamezni lokaciji vzorčenja, na grafu (b) so vzorci združeni po mesecih in so prikazana povprečja ± standardni odklon vrednosti osi CCA. Statistično značilni ($P < 0,05$) okoljski vektorji so prikazani na ordinaciji CCA s puščicami. 83

Sl. 19. Ordinacija CCA (kanonična korespondenčna analiza) združb AM gliv iz območja štirih mofet (travniških mofet, gozdnih mofet, italijanskih mofet in čeških mofet), kjer CCA os 1 pojasni 58,44 % variabilnosti znotraj združb AM gliv in CCA os 2 pojasni 25,95 % variabilnosti. Na sliki (a) točke predstavljajo združbe AM gliv na različnih lokacijah in ob različnih terminih vzorčenja, na sliki (b) so točke združene po mofetah in so prikazana povprečja ± standardni odklon vrednosti osi CCA. Statistično značilni ($P < 0,05$) okoljski vektorji so prikazani na ordinaciji CCA s puščicami. 85

Sl. 20. Diverziteta AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, izražena s Hillovim številom 0 (pestrost vrst), Hillovim številom 2 (izenačenost vrst) in Hillovim številom ∞ (dominanca vrst). Statistično značilne razlike med diverziteto AM gliv, na lokacijah z visoko koncentracijo CO₂ in diverziteto AM gliv na kontrolnih lokacijah (znotraj enega meseca), so prikazane z * ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test). Statistično značilne razlike (ANOVA, test mnogoterih primerjav – Tukey) v diverziteti AM gliv med različnimi meseci vzorčenja znotraj kontrolnih območij ali območij z visoko koncentracijo CO₂, so prikazane z različno črko (a, b, c, d). 87

Sl. 21. Porazdelitev proporcionalne abundance MOTU iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Porazdelitev je prikazana kot proporcionalna abundanca MOTU

v odvisnosti od abundance rangov MOTU na logaritemski skali. Siva barva krivulj označuje združbo AM gliv s kontrolnih območij, črna barva označuje združbo AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂. Različne barve krogov označujejo različne MOTU. 89

Sl. 22. Porazdelitev abundance molekularnih operativnih taksonomskih enot – MOTU iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Porazdelitev MOTU je prikazana kot abundanca rangov, kjer je abundanca MOTU predstavljena za leto 2010 in leto 2011. Bela barva stolpcev predstavlja sekvence AM gliv iz kontrolnih območij, črna barva stolpcev predstavlja sekvence AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂. Z rdečimi pikami smo označili MOTU5 in MOTU22, ki sta najbolj podobna filotipoma Glo85 in Glo86 iz objave Maček in sod. (2011). 90

Sl. 24. Profili T-RFLP mikrobnih združb, vzorčenih iz tal z območij z visoko koncentracijo CO₂ (visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (srednji CO₂) in kontrolnih območij (kontrola). Produkta PCR smo razrezali z encimom HaeIII. a) združba arhej in b) združba bakterij. Podatki so bili analizirani s programom Bionumeric 3.0. Vrednosti predstavljajo % podobnosti med profili vzorcev na podlagi Pearsonovih korelacij in klusterskega algoritma UPGMA. 95

Sl. 25. Profili T-RFLP mikrobnih združb, vzorčenih iz tal območij z visoko koncentracijo CO₂ (visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (srednji CO₂) in kontrolnih območij (kontrola). Produkta PCR smo razrezali z encimom HhaI. a) združba arhej in b) združba bakterij. Podatki so bili analizirani s programom Bionumeric 3.0. Vrednosti predstavljajo % podobnosti med profili vzorcev na podlagi Pearsonovih korelacij in klusterskega algoritma UPGMA. 96

Sl. 26. Krivulje redčenja MOTU arhej iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (črna barva; visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (siva barva; srednji CO₂) in kontrolno območje (bela barva; kontrola). MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 95 % podobnosti. 97

Sl. 27. Krivulje redčenja molekularnih operativnih taksonomskih enot – MOTU bakterij iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (črna barva; visok CO₂), srednjo koncentracijo

CO₂ (siva barva; srednji CO₂) in kontrolno območje (bela barva; kontrola). MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 95 % podobnosti. 98

Sl. 28. Ordinacijski graf mikrobnih združb, kjer (a, b) prikazuje združbo arhej in (c, d) združbo bakterij. Grafa temeljita na filogenetski razdalji UniFrac, prikazani z ordinacijo PCA (a, c) in na Jaccadovem indeksu, prikazanem z ordinacijo NMDS (b, d). Prikazani so vzorci iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (črni simboli), srednjo koncentracijo CO₂ (sivi simboli) in kontrolo (beli simboli). Statistično značilni okoljski vektorji so prikazani na ordinaciji NMDS (b, d) in predstavljajo koncentracijo CO₂ in O₂, pH, skupni N in dostopni P₂O₅. Največ variabilnosti znotraj združb tako arhej kot bakterij je bilo pojasnjeno s koncentracijo O₂ ($R^2 > 0,962$ v obeh primerih). 99

Sl. 29. Diverziteta mikrobnih združb z območij z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnega območja za bakterije (polni trikotniki) in arheje (prazni trikotniki). Prikazana so Hillova števila 0 (a; pestrost združb), 2 (b; izenačenost združb) in ∞ (c; dominanca združb). 100

Sl. 32. Filogenija kvasovke *Occultifur* species sp. nov., vzorčene iz tal travniške mofete v okolici Stavešincev, ter najbližjih filogenetskih sorodnikov kvasovke *Occultifur* species sp. nov. Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distančne metode združevanja najbližjega soseda (»neighbor joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap values«) s 1000 permutacijami. 117

OKRAJŠAVE

CCS	sistem za zajem in shranjevanje CO ₂ (»carbon caption and storage system«)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ITS	notranji prepisni vmesnik (»internal transcribed spacer«)
LSU	velika podenota ribosoma (»large ribosomal subunit«)
MOTU	molekulska operativna taksonomska enota
PCR	verižna reakcija s polimerazo (»polymerase chain reaction«)
ppm	število delov na milijon delov (»parts per milion«)
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
SSU	mala podenota ribosoma (»small ribosomal subunit«)
T-RFLP	dolžinski polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov (»terminal restriction fragment length polymorphism«)

TERMINOLOŠKI SLOVARČEK

accumulation curves	krivulje kopičenja vrst
constrained correspondence analysis	kanonična korespondenčna analiza (CCA)
niche theory	teorija niš
non-metric multidimensional scaling	nemetrično večrazsežnostno lestvičenje (NMDS)
principal component analysis	analiza glavnih komponent (PCA)
rarefaction curves	krivulje redčenja vrst
species abundance distribution	porazdelitev abundance vrst
species evenness	izenačenost vrst
species richness	pestrost vrst
multiplex identifier	ločevalec MID

1 UVOD

V različnih kopenskih ekosistemih potekajo številni procesi, kot so kroženje ogljika in mineralnih hranil, ki so močno odvisni od talnih mikroorganizmov in njihove diverzitetete (Fitter, 2005; Nielsen in sod., 2011). Tla in združbe organizmov, ki jih naseljujejo, so kompleksen in nedostopen sistem, ki ga je težko preučevati. Zavedanje o bogastvu biodiverzitetete v tleh je vedno večje, prav tako pa narašča tudi potreba po boljšem razumevanju delovanja talnih habitatov.

Raziskovanje procesov, ki vplivajo na diverziteteto združb različnih skupin organizmov, je že dolgo v središču ekoloških študij (npr. Hutchinson, 1953). Razumevanje teh procesov pa ima pomembno vlogo pri napovedi odzivov ekosistemov na spremembe v okolju, npr. klimatske spremembe (Rands in sod., 2010; Mace in sod., 2012). Študije biodiverzitetete so običajno bolj osredotočene na makroorganizme (npr. Emerson in Gillespie, 2008) kot na mikroorganizme. Razlogov za to je več; v preteklosti so bile omejitve predvsem metodološke, kar je skupaj z dinamiko talnega habitata pri preučevanju mikrobne biodiverzitetete omejilo razumevanje procesov, ki vplivajo na diverziteteto in funkcijo mikrobnih združb v talnih sistemih (Fitter, 2005). Razvoj molekularnih metod je pripomogel k boljшему poznavanju diverzitetete talnih mikroorganizmov (npr. Schloss, 2009; Lemos in sod., 2011), ob vse večjem poudarku na povezovanju mikrobne biodiverzitetete s procesi na nivoju združb (Jerman in sod., 2009; Dumbrell in sod., 2010a; Höfferle in sod., 2010; Maček in sod., 2011; Mandić - Mulec in sod., 2012; Šibanc in sod., 2014). Kljub temu je podrobnejše razumevanje vpliva abiotskih dejavnikov okolja na strukturiranje združb talnih mikroorganizmov še vedno omejeno in potrebno nadaljnjih raziskav.

Tovrstne raziskave so v naravnih ekosistemih težavne zaradi specifičnih lastnosti talnih ekosistemov, kjer so močni, usmerjeni selekcijski pritiski, redko časovno in prostorsko usmerjeni in se pogosto tudi prekrivajo z drugimi karakteristikami tal. V naši raziskavi smo uporabili specifične ekosisteme (naravne izvire CO₂ ali mofete), ki omogočajo usmerjeno raziskovanje vpliva abiotskih dejavnikov okolja na organizme v okoljskih razmerah. Mofete so območja z izhajanjem čistega CO₂ geološkega izvora, zaradi česar so spremembe v koncentraciji talnih plinov relativno konstantne in dolgotrajne (Vodnik in sod., 2006) in zato predstavljajo dober modelni sistem za raziskave vpliva abiotskih dejavnikov okolja na dinamiko v sestavi mikrobnih združb (Maček in sod., 2011).

Za naše raziskave smo izbrali štiri vrstno pestre in funkcionalno pomembne skupine talnih organizmov: (1) arbuskularne mikorizne (AM) glive, (2) arheje, (3) bakterije in (4) kvasovke. AM glive so obligatni rastlinski endosimbionti in splošno razširjena skupina talnih gliv, ki kolonizira korenine približno dveh tretjin kopenskih rastlin (Vandenkoornhuysen in sod., 2002). AM glive pridobivajo ves ogljik od rastlinskega partnerja in v zameno nudijo rastlinam vrsto koristi, med drugim tudi povečan privzem

mineralnih hranil iz tal, kar močno vpliva na dinamiko in diverzitetu rastlinskih združb (npr. Fitter, 2005; Rosendahl, 2008; Smith in Read, 2008). Morfološka identifikacija AM gliv v rastlinskih koreninah ni možna (Merryweather in Fitter, 1998), zato karakterizacija združb AM gliv, ki kolonizirajo korenine rastlin v različnih okoljih, temelji na analizi DNK (Helgason in sod., 1998). Čeprav je bilo izvedenih kar nekaj okoljskih raziskav diverzitet AM gliv v številnih kopenskih habitatih (Öpik in sod., 2006; Dumbrell in sod., 2010a; Öpik in sod., 2010), tudi v povezavi z raziskavami vplivov okoljskih dejavnikov na sestavo njihovih združb (Lekberg in sod., 2007; Fitzsimons in sod., 2008; Schechter in Bruns, 2008), so prostorsko in časovno dinamiko v sestavi mikrobnih združb upoštevali le v redkih študijah (Santos - González in sod., 2007; Dumbrell in sod., 2011).

Tla naseljujejo tudi drugi mikroorganizmi (npr. druge skupine gliv, arheje in bakterije), med katerimi številne živijo v interakciji z rastlinskimi koreninami v območju rizosfere, nekateri pa tudi v interakciji z AM glivami, npr. endosimbiontske bakterije (Miransari, 2011). Bakterije in arheje so najštevilčnejši organizmi v tleh in vplivajo na številne biokemične procese v tleh in na številne biogeokemijske cikle. Arheje so bile sprva opredeljene kot prebivalke ekstremnih območij (Chaban in sod., 2006). Kasneje se je izkazalo, da so prisotne v številnih ekosistemih, kjer lahko vplivajo tudi na kroženje dušika in ogljika (Chaban in sod., 2006; Francis in sod., 2007). Za razliko od simbiotskih AM gliv se številne druge skupine gliv, npr. kvasovke, pojavljajo v različnih substratih, iz katerih so bile tudi uspešno izolirane (Spencer in Spencer, 1997). V tleh imajo filamentozne glive večjo abundanco kot kvasovke (Gams, 1992), zato je tla težko definirati kot habitat kvasovk. Kljub temu pa pojav specifičnih vrst kvasovk, ki so bile večkrat izolirane samo iz talnih vzorcev, kaže na pogosto pojavljanje kvasovk tudi v talnem habitatu (Phaff in Stramer, 1987).

Talni mikroorganizmi so lahko aerobni, anaerobni ali fakultativno anaerobni. Mikorizne glive veljajo za aerobne organizme (Smith in Read, 2008). Fakultativno anaerobni organizmi (nekateri arheje, bakterije in kvasovke) lahko, v določenih primerih, fermentirajo tudi v aerobnih razmerah, bolj značilna pa je fermentacija v anaerobnem okolju (Maier in sod., 2009). Med anaerobne organizme spadajo tudi metanogeni mikroorganizmi, ki v anoksičnih razmerah kot stranski produkt v metaboličnih procesih tvorijo metan. Med taka anaerobna okolja spadajo, do neke mere, tudi območja mofet (npr. Šibanc in sod., 2014).

Pri raziskavah v okviru doktorskega dela smo si zastavili več izhodiščnih hipotez.

- V koreninah rastlin na območjih z visoko koncentracijo talnega CO₂ je kolonizacija korenin z mikoriznimi glivami manjša od tiste v koreninah rastlin s kontrolnih območij. Tudi v koreninah rastlin, vzorčenih na območjih z visoko koncentracijo CO₂, so prisotne karakteristične morfološke strukture (arbuskuli), ki kažejo na fiziološko aktivno simbiozo in izmenjavo hranil med rastlino in AM glivami.
- Taksoni AM gliv, ki so bili v dosedanjih raziskavah združb AM gliv z območij mofet v Stavešincih potrjeni izključno v vzorcih z območij z močno povečano koncentracijo CO₂, so prisotni tudi v kontrolnih vzorcih. Ti taksoni so na območjih kontrolnih koncentracij CO₂ redki in so bili zato pri dosedanjih raziskavah spregledani in pod mejo detekcije uporabljenih konvencionalnih molekularnih pristopov (kloniranja in sekvenciranja po Sangerju). Lahko pa redke taksone zaznamo z uporabo nove generacije visokozmogljivega paralelnega sekvenciranja (npr. 454 GS-FLX, Roche).
- Sestava združb AM gliv, arhej in bakterij se na območjih z visoko koncentracijo CO₂ razlikuje od sestave kontrolnih združb. Primarni dejavnik, ki na območjih naravnih izvirov CO₂ določa sestavo združb AM gliv, arhej in bakterij, je prisotnost geološkega plina in posledično talna hipoksija in ne druge karakteristike tal.
- Glavni dejavnik, ki vpliva na sestavo združb AM gliv in variabilnost med njimi na geografsko oddaljenih naravnih izviroh CO₂ (Češka, Italija, gozdni izviri na Stavešinskem vrhu in travniški izviri v okolici Stavešincev), je prisotnost geološkega plina in ne geografska oddaljenost območij oziroma drugi talni dejavniki.
- V tleh, ki so izpostavljena visokim koncentracijam CO₂ geološkega izvora, v združbah arhej in bakterij prevladujejo anaerobni in acidofilni taksoni.
- Diverziteti arhej je večja na območjih z visoko koncentracijo CO₂ (ekstremofili), medtem ko je diverziteti bakterij na teh območjih manjša.
- Sposobnost kvasovk, v naši raziskavi izoliranih iz območja naravnih izvirov CO₂, da rastejo v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂, kaže na potencialno povezanost z njihovo fermentativno sposobnostjo. Na območju visoke koncentracije CO₂ na travniških mofetah je večja abundanca fermentativnih kot nefermentativnih vrst kvasovk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NARAVNI IZVIRI CO₂

Naravni izviri CO₂ (mofete) so ekstremni ekosistemi, kjer ogljikov dioksid (CO₂) geološkega izvora doseže površino tal in povzroča bistvene spremembe v sestavi talnega zraka (npr. Vodnik in sod., 2006, 2009). Pojavljajo se na mestih vulkanske aktivnosti in jih v Evropi lahko najdemo v Avstriji, na Češkem, v Franciji, Grčiji, Islandiji, Italiji, na Madžarskem, v Nemčiji, na Portugalskem, v Romuniji, Sloveniji in Španiji (Pfanž in sod., 2004). Za te ekosisteme je značilno, da CO₂ izvira iz podzemnih bazenov plina, ki je ujet v plašču zemeljske skorje. Tam nastaja zaradi taljenja karbonatnih kamnin, izpostavljenih visoki temperaturi in tlaku (Marini, 1997). Na površje prihaja skozi površinske razpoke. Koncentracija CO₂ v tleh pogosto močno preseže običajne talne in atmosferske koncentracije tega plina, kar vpliva tudi na koncentracije drugih talnih plinov, kot na primer kisika (O₂), katerega koncentracija je obratno sorazmerna s koncentracijo geološkega CO₂ (Vodnik in sod., 2009; Maček in sod., 2011). Geološki CO₂ povzroča na mofetah tudi zakisanost tal (Jamnik, 2005). Že v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so se pojavile prve objave o uporabi naravnih izvirov CO₂ za preučevanje dolgoročnih vplivov povečane koncentracije atmosferskega CO₂ na rastline (Miglietta in sod., 1993; Raschi in sod., 1997), medtem ko so se raziskave, osredotočene na talne mikroorganizme, pojavile kasneje (npr. Maček in sod., 2005; Videmšek in sod., 2006; Maček in sod., 2009, 2011; Krüger in sod., 2009a; Oppermann in sod., 2010; Frerichs in sod., 2013; Maček, 2013; Šibanc in sod., 2014).

Mofete predstavljajo relativno stabilno lokalno spremembo abiotskega okolja tal in so se v prvih študijah teh območij primarno uporabljale kot modelni sistem za preučevanje posledic dolgotrajne povečane atmosferske koncentracije CO₂ na fiziologijo rastlin (Raschi in sod., 1997). Prve študije, izvedene na območju mofet, so pokazale negativne učinke izpostavljenosti rastlin geološkemu plinu na fotosintezo pri različnih rastlinskih vrstah (npr. nižja neto fotosinteza, nižja učinkovitost karboksilacije in višja kompenzacijska točka CO₂), zmanjšano sposobnost privzema mineralov, manjšo rast rastlin (Vodnik in sod., 2002a, 2002b; Pfanž in sod., 2004, 2007) in inhibicijo dihanja korenin (Maček in sod., 2005). Zanimivo je, da je bila večina začetnih raziskav na mofetah osredotočena skoraj izključno na procese v nadzemnih delih rastlin. Ker je CO₂ v mofetah geološkega izvora in se prezračuje skozi tla, najprej prizadene korenine rastlin in talne organizme (Maček, 2004; Maček in sod., 2005). Rastline, ki rastejo na območjih mofet, so sposobne anatomskih prilagoditev na dane razmere, npr. tvorbe nadomestnih, adventivnih korenin, obenem lahko kisik transportirajo do korenin preko specializiranih prezračevalnih tkiv – aerenhimov (Videmšek in sod., 2006). Na teh območjih prihaja do kopičenja nerazgrajene organske snovi zaradi zmanjšane aktivnosti talnih mikroorganizmov in manjše mikrobne biomase (npr. Maček in sod., 2009). Prav tako morajo biti mikrobi, ki živijo na teh območjih, sposobni preživeti v ekstremnih razmerah (Maček in sod., 2009; Videmšek in sod., 2009;

Maček in sod., 2011, 2012; Krüger in sod., 2009a; Oppermann in sod., 2010; Frerichs in sod., 2013; Šibanc in sod., 2014). Do sedaj je bilo usmerjenih relativno malo raziskav v preučevanje biodiverzitete in ekologije talnih mikroorganizmov v tem okolju (Oppermann in sod., 2010; Maček in sod., 2011; Frerichs in sod., 2013; Šibanc in sod., 2014).

2.1.1 Pomen raziskav na naravnih izviri CO₂

Naravne izvire CO₂ lahko uporabljamo kot modelni sistem, s katerim lahko preučujemo potencialni vpliv dolgotrajnega uhajanja CO₂ iz podzemnih rezervoarjev sistemov za zajem in shranjevanje CO₂ (CCS) na ekosisteme (Krüger in sod., 2009a; Oppermann in sod., 2010; Frerichs in sod., 2013).

Ogljikov dioksid predstavlja najpomembnejši antropogeni toplogredni plin v atmosferi; njegove vrednosti so se povečale iz 278 ppm (pred letom 1750) na 393 ppm (2012), s povprečnim prirastom (10-letno povprečje) 2,02 ppm letno (WMO, 2013). Jasno postaja, da potrebujemo rešitve, kako hitro zmanjšati emisije toplogrednih plinov, in sicer takšne, ki hkrati dopuščajo nadaljnjo gospodarsko rast in razvoj alternativnih virov energije. Direktno zajetje ogljikovega dioksida iz elektrarn na fosilna goriva ter njegovo shranjevanje v poroznih geoloških formacijah je ena izmed možnosti, ki veliko obetajo. Z načini zajemanja, transporta in shranjevanja CO₂ in prav tako s stabilnostjo in z varnostjo sistemov zajemanja in shranjevanja ogljika na industrijskih območjih se je ukvarjalo veliko raziskav, kar je v preglednem članku opisal Pires in sod. (2011). Da bi lahko tehniko zajemanja in shranjevanja ogljika uporabili kot globalno rešitev, je potrebno upoštevati vse varnostne vidike in potencialne vplive na okolje, kar pa zajema tako preučevanje samega rezervoarja, v katerem se shranjuje CO₂ kot tudi, sicer malo verjetno, uhajanje CO₂ iz teh rezervoarjev in vpliv tega na okolje (Lal, 2008; Patil in sod., 2010; Al-Traboulsi in sod., 2012; Noble in sod., 2012).

V zadnjih letih so začeli uporabljati naravne izvire CO₂ predvsem kot modelne sisteme pri preučevanju odzivov rastlin in talnih mikrobov na potencialno uhajanje CO₂ iz sistemov CCS (npr. Lal, 2008; Krüger in sod., 2011; Noble in sod., 2012). Noble in sod. (2012) so v preglednem članku objavili pregled različnih tehnik, ki so primerne za biološki monitoring potencialnega uhajanja CO₂ iz sistemov CCS. Te tehnike vključujejo tako vegetacijske popise, štetje bakterijskih celic in različne tehnike profiliranja mikrobnih združb, ki so bile do sedaj izvedene na naravnih izviri CO₂, kot modelnih sistemih za preučevanje potencialnega uhajanja CO₂ ali na plitvih mestih, kjer shranjevanje CO₂ že poteka (Noble in sod., 2012).

Naravni izviri CO₂ tako predstavljajo edinstven primer za preučevanje odzivov rastlin in talnih organizmov na dobro karakteriziran (Vodnik in sod., 2006, 2009), lokaliziran, dolgotrajen selekcijski pritisk (Maček in sod., 2011; Maček, 2013). To pa poleg

aplikativnih raziskav, povezanih s sistemi CCS, omogoča tudi povsem bazične raziskave različnih področij v ekologiji tal in različnih mehanizmov, ki vplivajo na diverzitetu talnih organizmov v naravnih ekosistemih (Maček, 2013). S tem lahko pripomorejo k boljšemu razumevanju talne biodiverzitetne in njenih ekoloških funkcij.

2.1 BIODIVERZITETA MIKROBNIH ZDRUŽB

Pestrost vrst je število različnih vrst na določenem prostoru, medtem ko je biodiverzitetna celotna pestrost živih organizmov, vključno s pestrostjo ekoloških kompleksov, v katerem živijo. Biodiverzitetna je tako pestrost v najširšem pomenu besede, (i) na ravni genoma, kjer med osebki spoznavamo razlike v razporeditvah in frekvencah alelov na posameznih lokusih, (ii) na ravni osebkov in njihovih razlik v življenjskih strategijah, (iii) na ravni populacij, kjer opisujemo različne ekotipe, podvrste, (iv) na ravni vrst, kjer je biodiverzitetna enaka vrstni pestrosti, (v) na ravni združb, kjer spoznavamo pestrost interakcij med posameznimi vrstami, (vi) na ravni ekosistemov, kjer obravnavamo pestrost različnih odzivov združbe kot celote na okolje in (vii) na ravni biomov (Tome, 2006). V poenostavljeni obliki pa biodiverziteti pripisujemo tri glavne ravni pestrosti: gensko, vrstno in ekosistemsko (Tome, 2006). Večja pestrost vrst v združbi pomeni večjo biodiverzitetno. Kljub razlikam med pojmom pestrost vrst in biodiverzitetna, slednjo pogosto predstavljamo kar s številom vrst v združbi.

Poznamo tri oblike pestrosti vrst: alfa, beta in gama diverzitetno.

Alfa diverzitetna ali lokalna diverzitetna je število vrst in osebkov znotraj malega, relativno uniformnega območja (Tome, 2006).

Beta diverzitetna ali medobmočna diverzitetna je skupno število vrst v dveh sosednjih območjih, ki opisuje, za koliko se pestrost spremeni, ko se premaknemo z območja z eno združbo na sosednje območje z drugo združbo. Pomembno pri tem je, koliko vrst imata združbi skupnih in koliko jih živi samo v eni ali drugi (Tome, 2006).

Gama diverzitetna ali regijska diverzitetna je število vrst na različnih območjih širokega geografskega prostora in opisuje pestrost na več različnih območjih v širšem geografskem prostoru, ki so nizana eno ob drugem (Tome, 2006). Vsebinsko povezuje alfa in beta diverzitetno.

2.1.1 Problematika molekulske karakterizacije mikrobnih združb

Natančna identifikacija mikroorganizmov je bistvenega pomena pri raziskavah biodiverzitete in funkcije mikroorganizmov v ekosistemih. Identifikacija je problematična predvsem pri skupinah mikroorganizmov, kjer večina taksonomije temelji na sekvencah, pridobljenih v molekulskih študijah, kar je značilno tako za AM glive kot za arheje in bakterije. Pri filogenetskih raziskavah mikroorganizmov se najpogosteje uporablja jedrna DNK, ki kodira ribosomske RNK (rRNK) (Schloss in Westcott, 2011). **Mala podenota ribosoma** SSU rRNK je ena najbolj ohranjenih regij DNK. Uporablja se za konstrukcijo vej filogenetskih dreves, ki vključujejo kraljestva, debla, razrede in redove (Hwang in Kim, 1999). **5'8S rRNK** je podobno ohranjena kot SSU, vendar je s približno 150 bp prekratka za zadostno količino filogenetskih informacij (Hwang in Kim, 1999). **Velika podenota ribosoma** LSU rRNK je daljša od SSU in omogoča raziskovanje filogenetskih odnosov na ravni redov ali družin. Domeni D1 in D2 predstavljata delno nukleotidno zaporedje 26S ribosomske RNK (LSU). Skupaj obsegata približno 600 baz. Za reševanje odnosov bližje sorodnih taksonov, torej ločevanje rodov, vrst in populacij, so primerne regije, ki obsegajo **dve notranji prepisni vmesniški regiji 1 in 2** (ITS1, ITS2), IGS in domeno 2 (D2) 26S rRNK (LSU) (Hwang in Kim, 1999; preglednica 1). Regije ITS so zaradi manjšega evolucijskega pritiska zelo variabilne, nabirajo nevtralne mutacije, zato se jih uporablja za ločevanje vrst znotraj rodu (Kranjec, 2008). Nukleotidna zaporedja regije ITS1 in **regije medgenskega vmesnika** (IGS) se uporabljajo pri določanju odnosov med populacijami znotraj iste vrste (Hwang in Kim, 1999). Ugotovili so, da pri molekulski sistematiki ne omogočajo vse regije identifikacije izbrane taksonomske ravni (Hwang in Kim, 1999). Na podlagi različne hitrosti evolucije znotraj genoma se ločijo odseki genoma, katere lahko uporabljamo za ločevanje taksonov na različnih ravneh (preglednica 1).

Preglednica 1. Regije uporabe posameznega molekulskega označevalca oz. gena za ločevanje taksonov na različnih ravneh (povzeto po Kranjec, 2008).

Table 1. Regions of gene marker, for different depth of taxon identification (according to Kranjec, 2008).

	Kraljestvo	Deblo	Razred	Red	Družina	Rod	Vrsta	Populacija
Jedrna rRNA								
SSU (16-18S)	—————				-----			
LSU (23-28S)			—————			-----		
5.8S	—————				-----			
IGS							—————	
ITS						—————		
Mitohondrijska rRNA								
rDNA								
12S		—————				-----		
16S					—————		-----	
Protein								
Kodirajoči geni								
ND1				-----	—————			-----
ND2				-----	—————			-----
COI				-----	—————			-----
COII				-----	—————			-----
Cytb				-----	—————			-----

Legenda: polne črte predstavljajo območja občutljivosti molekulskega označevalca oz. gena, črtkane pa redkeje pojavljajoča območja.

Okrajšave: **molekulski označevalec jedrne ribosomske RNK** – mala podenota ribosoma (16-18S SSU), velika podenota ribosoma (23-28S LSU), 5'8S, medgenski vmesnik (IGS), notranji prepisani vmesnik (ITS); **molekulski označevalec mitohondrijske ribosomske RNK** – mala podenota ribosoma (12S), velika podenota ribosoma (16S) in **molekulski označevalec genov za proteine** – NADH dehidrogenaza (ND1, 2), citokrom oksidaza (COI, II) in citokrom b (Cytb).

Poznamo dva pogosto uporabljena pristopa grupiranja sekvenc v gruče (Schloss in Westcott, 2011), na podlagi njihove podobnosti referenčnim sekvencam, kjer identificiramo filotipe oziroma taksoni ali na podlagi njihove podobnosti drugim sekvencam v združbi, kjer identificiramo molekulske operativne enote – MOTU (Schloss in Westcott, 2011). Večina mikrobiologov raje izbere metode, ki temeljijo na identifikaciji filotipov, saj te omogočajo primerjavo sekvenc s sekvenco opisanega in kultiviranega mikroba (Schloss in Westcott, 2011). Tu se lahko pojavi problem, saj lahko imajo organizmi, ki pripadajo isti vrsti različne fenotipe, oziroma lahko organizmi, ki imajo iste fenotipe, pripadajo različnim taksonomskim linijam (Schloss in Westcott, 2011). Ker pa večina taksonomske identifikacije temelji na kultiviranih organizmih, se pojavi problem, saj se veliko talnih mikrobov ne da gojiti v čistih kulturah. Sem spadajo tako arheje (Bintrim in sod., 1997), bakterije (Janssen in sod., 2002) kot tudi arbuskularne mikorizne glive (Krüger in sod., 2009b). Iz tega sledi, da je zelo težko določiti vrste mikrobov in še

težje nato konsistentno definirati njihove družine, rede in razrede. Metode, ki temeljijo na grupiranju («clustering») sekvenc v MOTU, premostijo veliko težav, ki se pojavljajo pri filotipskih metodah. Glavna prednost je določanje vseh gruč MOTU na podlagi iste metode grupiranja, neodvisno od tega ali so sekvence primerljive z reprezentativnimi sekvencami znotraj taksonomsko določenih in opisanih vrst ali ne. Metode MOTU temeljijo na grupiranju sekvenc in ne na njihovi klasifikaciji. To pomeni, da je pojav dveh sekvenc v isti gruči MOTU odvisen samo od drugih sekvenc v tej gruči.

V predstavljeni doktorski disertaciji temelji molekulska karakterizacija združb AM gliv na DNK nukleotidnem zaporedju 18S, oziroma pri arhejah in bakterijah na DNK nukleotidnem zaporedju 16S ribosomske RNK male podenote ribosoma (SSU). Iz gruče sekvenc male podenote ribosoma rRNK genov smo na podlagi vsaj 95 (arheje, bakterije) oz. 97 % (AM glive) podobnosti med sekvencami določili molekulske operative taksonomske enote (MOTU). Iz gruč MOTU smo nato izbrali najbolj abundantno sekvenco, ki torej predstavlja reprezentativno sekvenco posameznega MOTU. To nam omogoča, da na podlagi sekvenc DNK opišemo pojav določenega organizma v okolju, čeprav identifikacija do vrste ni mogoča (Öpik in sod., 2013).

V nasprotju z AM glivami, arhejami in bakterijami temelji molekulska identifikacija kvasovk na domeni D1 in D2 delnega DNK nukleotidnega zaporedja 26S ribosomske RNK velike podenote ribosoma (LSU). Pri kvasovkah se uporabljata izključno regiji D1 in D2 26S rRNK, ki predstavljata standardni fragment za identifikacijo kvasovk. Ker pa je veliko kvasovk že izoliranih in opisanih, nam to omogoča identifikacijo na nivoju vrste.

2.2 TALNI MIKROORGANIZMI NA OBMOČJIH MOFET

Študij, ki bi se osredotočile na vpliv povečane koncentracije talnega CO₂ na združbe talnih mikroorganizmov, je malo. Povzetek raziskav vpliva abiotskega stresa na talne mikrobove, ki so potekale v zadnjem desetletju na različnih območjih mofet po svetu, je opisan v preglednem članku (Maček, 2013; preglednica 2), objavljenem v reviji *Acta Agriculturae Slovenica*. Če povzamemo na kratko, so bile raziskave vpliva abiotskega stresa na različne mikrobove v tleh opravljene tako na mofetah v okolici Stavešincev, kot še vsaj na štirih lokacijah mofet v Evropi, te so Cheb basin (Republika Češka), Bossoleto in Latera Caldera (Italija) in Laacher See (Nemčija) ter eni mofeti na območju Mammoth Mountain v Združenih državah Amerike in eni mofeti na območju Hakanoa v Novi Zelandiji.

Preglednica 2. Seznam študij s področja raziskav mikrobiologije in biodiverzitet talnih mikroorganizmov na območjih mofet (povzeto po Maček, 2013).

Table 2. A list of studies on the different aspects of microbial biology and diversity in mofette soils (according to Maček, 2013).

Skupine mikrobov	Regija rRNK gena in / ali uporabljena metoda	Lokacija mofete	Literatura *
AM glive	gen 16S rRNK, T- RFLP, pirosekvenciranje (454 GS-FLX, Roche), knjižnica klonov	Stavešinci, SI, Bossoleto, IT, Cheb basin, CZ	Maček in sod., 2013; Šibanc in sod., 2013
AM glive	kolonizacija korenin rastlin, koncentracija glomalina v tleh	Stavešinci, SI	Maček in sod., 2012
AM glive	gen 16S rRNK, RFLP, knjižnice klonov, kolonizacija korenin rastlin	Stavešinci, SI	Maček in sod., 2011
Glive kvasovke	gen 26S rRNK domena D1/D2, sekvenciranje, tehnike izolacije in kulture	Stavešinci, SI	Šibanc in sod., 2012
AM glive	kolonizacija korenin rastlin, koncentracija glomalina v tleh	Hakanoa, Nova Zelandija	Rillig in sod., 2000
Talni mikrobi	število celic (qPCR) in meritve aktivnosti, geni <i>nirK</i> , DGGE	Larcher See, DE	Krüger in sod., 2009, 2011

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Seznam študij s področja raziskav mikrobiologije in biodiverzitet talnih mikroorganizmov na območjih mofet (povzeto po Maček, 2013)

Arheje in bakterije v tleh	gen 16S rRNK, DGGE, meritve aktivnosti	Larcher See, DE	Frerichs in sod., 2013
Arheje in bakterije v tleh	gen 16S rRNK, T-RLFP, klonske knjižnice	Stavešinci, SI	Šibanc in sod., 2014
Bakterije, ki fiksirajo CO ₂	gen <i>cbbL</i> , RFLP	Stavešinci, SI	Videmšek in sod., 2009
Talni mikrobi	s substratom inducirana respiracija (SIR)	Stavešinci, SI	Maček in sod., 2009
Talni mikrobi	lipidni biomarkerji in analiza ¹³ C, število celic (qPCR), biomasa in meritve aktivnosti	Latera Caldera, IT	Beaubien in sod., 2008, Oppermann in sod., 2010
Talni mikrobi	gen 16S-23S rRNK (ITS), Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), qPCR, PLFA, analiza encimov	Mammoth Mountain, ZDA	McFarland in sod., 2013

*Seznam literature je v članku Maček, 2013, Acta Agriculturae Slovenica 101 – 2, str: 209–217.

Raziskav, ki so bile s tega področja izvedene na travniški mofeti v Stavešincih, ki je najbolj raziskano območje tudi v sklopu tega doktorskega dela, je pet. (1) Maček in sod. (2009) so prvi poročali o manjšem SIR (s substratom induciranim dihanjem) v tleh na območju travniške mofete v okolici Stavešincev, kar kaže na manjšo mikrobnno biomaso in manjšo mikrobnno aktivnost v tleh, ki so izpostavljena visokim koncentracijam CO₂ geološkega izvora. (2) Videmšek in sod. (2009) so preučevali številčnost in raznolikost genov *cbbL*, ki kodirajo veliko podenoto RuBisCO pri bakterijah. Opazili so manjše število kopij *cbbL* genov (avtotrofnih, CO₂-fiksirajočih bakterij) v tleh na območju z največjimi koncentracijami CO₂ v primerjavi s kontrolnimi območji. (3) Maček in sod. (2011), ki so raziskovali diverzitetu in sestavo združb AM gliv, poročajo o pojavu specifičnih taksonov AM gliv na območjih z visoko koncentracijo geološkega CO₂ v tleh, kar kaže na prilagajanje AM gliv na abiotske dejavnike v tleh, predvsem pomanjkanje kisika, kot posledica odziva na dolgotrajni abiotski selekcijski pritisk. (4) Maček (2012) so preučevali kolonizacijo korenin z AM glivami ter koncentracijo glomalina v tleh na območju travniških mofet v okolici Stavešincev. Med koncentracijo talnega CO₂ ter

kolonizacijo korenin z AM glivami in s koncentracijo glomalina v tleh niso ugotovili statistično značilne povezave. Zadnja objava, (5) Šibanc in sod. (2014), ki izhaja iz raziskav sestave in diverzitet talnih združb arhej in bakterij, ki so potekale v okviru predmetne doktorske disertacije, je podrobneje predstavljena v nadaljevanju v poglavjih 3.4 in 4.3.

2.2.1 Arbuskularne mikorizne glive (deblo Glomeromycota)

2.2.1.1 Arbuskularna mikoriza

Mikoriza je sožitje rastlin in gliv. Delimo jo na ektotrofno (ektomikorizo) in endotrofno (endomikorizo). Za endotrofno mikorizo je značilno, da hife gliv vstopajo v celice primarne skorje vse do endoderma ne pa tudi do centralnega cilindra korenine. Sem uvrščamo orhidejsko, erikoidno in arbuskularno mikorizo.

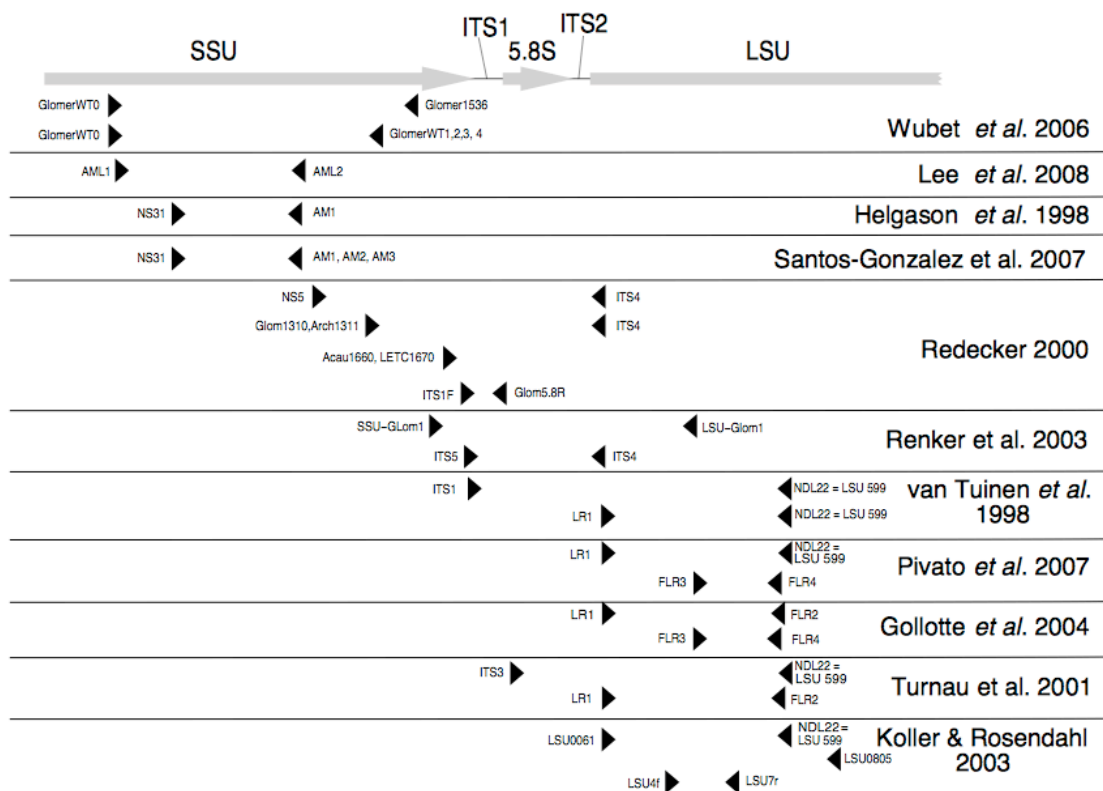
Arbuskularne mikorizne (AM) glive so obligatni simbionti, kar pomeni, da za rast potrebujejo rastlinskega partnerja. AM glive tvorijo samostojno, monofiletsko deblo Glomeromycota (Schüßler in sod., 2001), ki je enakovredno drugima velikima debloma gliv Ascomycota in Basidiomycota. Arbuskularna mikoriza je najbolj pogost in najstarejši tip mikorize, zato jo lahko imenujemo tudi mati vseh kopenskih simbioz (Parniske, 2008). Ocenjujejo, da je nastala pred več kot 400 milijoni let (Remy in sod., 1994). Razvijala se je v času, ko so rastline kolonizirale kopno in je imela pomemben vpliv pri sprejemanju mineralnih hranil v rastline, saj prve kopenske rastline še niso imele pravih korenin, ampak rizome (Parniske, 2008). V kopenskih ekosistemih je simbiotski odnos med rastlinami in mikoriznimi glivami prisoten skoraj povsod, pri čemer 90 % vseh rastlinskih vrst tvori različne tipe mikorize (Smith in Read, 2008). Velika večina kopenskih rastlin prejme anorganska hranila s posrednim vnosom prek simbiotskih AM gliv in ne z neposrednim črpanjem iz tal s koreninami (Smith in Read, 2008; Neumann in George, 2010). V zameno rastline zagotavljajo do 20 % ogljikovih hidratov glivam kot edini vir njihove energije (Bago in sod., 2000). Izmenjava hranil v rastlinske celice korenin poteka predvsem na glivno-rastlinskem simbiotskem stiku, ki se tvori okoli fino razvejanih glivnih arbuskulov (Parniske, 2008). AM glive tvorijo v tleh mrežo nitastih hif, ki tvorijo zunajkoreninski micelij. Hife na površini korenine tvorijo apresorije, preko katerih mehansko prodirajo v epidermalne celice korenin. Pri arbuskularni mikorizi tvori gliva v koreninski skorji značilne morfološke strukture, arbuskule, včasih tudi vezikle. Arbuskuli predstavljajo močno stanjšane in razvejane hife gliv, pri čemer se ustvari velika membranska površina, ki služi izmenjavi snovi med obema partnerjema v simbiozi, medtem ko vezikli služijo shranjevanju rezervnih snovi. Gliva se lahko razmnožuje s sporami, ki so pomembne tudi za morfološko določevanje posameznih vrst (taksonov) in so taksonomski znak. Spore AM gliv so lahko velike tudi do nekaj sto µm in vsebujejo veliko število celičnih jeder (povzeto po Maček, 2009).

AM glive pomembno vplivajo na ekosistemske procese, kot so kroženje hranil, produktivnost in kompeticija rastlin (Hartnett in Wilson, 1999; van der Heijden in sod., 2003; Scheublin in sod., 2007) in na diverzitetu rastlin (van der Heijden in sod., 1998; Klironomos in sod., 2000; O'Connor in sod., 2002). Kljub ekološkemu pomenu mikorize je znano presenetljivo malo o ekoloških in fizioloških odzivih mikoriznih gliv na hipoksijo (Maček in sod., 2011, 2012), ki je v tleh pogosta (Perata in sod., 2011).

2.2.1.2 Molekulska identifikacija AM gliv

Tradicionalno so za identifikacijo arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv služile morfološke značilnosti spor. V odsotnosti spor lahko glivne strukture znotraj korenin identificiramo samo do družine (Merryweather in Fitter, 1998), vendar tudi ta identifikacija ni zanesljiva. Nastanek spor je odvisen od fizioloških lastnosti AM gliv ter od okoljskih razmer. V določenih razmerah in tekom določenega obdobja v letu lahko nekatere taksonomske skupine AM gliv tvorijo veliko število spor, vendar se pogosto zgodi tudi, da AM glive ne tvorijo spor (Redecker in sod., 2003). Druga ovira pri morfološki identifikaciji AM gliv je, da so spore v naravnem okolju pogosto parazitirane ali prestare za dobro identifikacijo. To težavo lahko premostimo z vzpostavitvijo t. i. »traj kultur« oz. mikorize v lončnih kulturah z gostiteljskimi rastlinami. Tudi v primeru, da imamo na razpolago dovolj zdravih spor, nam to ne omogoča zanesljive identifikacije AM gliv, saj je slednja na podlagi morfoloških znakov pri številnih AM glivah še vedno pomanjkljiva (Redecker in sod., 2003), nekatere glive pa spor sploh ne tvorijo.

Molekulska identifikacija omogoča identifikacijo AM gliv v koreninah rastlin. Temelji na ribosomski RNK (rRNK), ki se nahaja v jedru genoma. Geni, ki kodirajo to genomsko regijo, so dostopni v velikem številu kopij in vsebujejo veliko ohranjenih kot tudi variabilnih regij, kar omogoča ločevanje taksonov na različnih ravneh. Prve sekvence male podenote ribosoma (18S SSU) AM gliv so določili Simon in sod. (1992). Do danes je bilo objavljenih kar nekaj različnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odsekov sekvenc, specifičnih za različne skupine AM gliv. Najpogosteje uporabljen par začetnih nukleotidov male podenote ribosoma (18S SSU) v okoljskih raziskavah je AM1 (Helgason in sod., 1998) in NS31 (Simon in sod., 1992), kjer je dolžina pomnoženega fragmenta DNK približno 550 baznih parov. NS31 pomnožuje sekvence vseh evkariontov, medtem ko AM1 izključuje družini *Archaeosporales* in *Paraglomerales* (Schüßler in sod., 2001). Za ta par začetnih oligonukleotidov je značilno, da pomnožujejo tudi precej za AM glive nespecifičnih fragmentov, kar je bil tudi povod za izdelavo novih začetnih oligonukleotidov AML1-AML2 (Lee in sod., 2008; dolžina pomnoženega fragmenta DNK je ~800 bp), ki vsebujejo tudi fragment AM1-NS31, in pomnožuje predstavnike vseh družin AM gliv. Sledile so še objave drugih začetnih nukleotidov za specifično pomnoževanje DNK različnih taksonomskih skupin AM gliv, tako na mali (SSU), kot na veliki podenoti ribosoma (LSU), ter na notranjem prepisnem vmesniku (ITS) (slika 1).



Slika 1. Shematski pregled kombinacij različnih začetnih oligonukleotidov, ki se uporabljajo pri raziskavah arbuskularnih mikoriznih gliv. Na vrhu slike so prikazani molekularni označevalci jedrne ribosomske RNK – mala podenota ribosoma (16-18S SSU), velika podenota ribosoma (23-28S LSU), 5.8S medgenski vmesnik (IGS) in notranji prepisani vmesnik (ITS). Trikotniki prikazujejo smer in mesto prijemanja začetnih oligonukleotidov (povzeto po Stockinger, 2010).

Figure 1. Schematic overview of different primer combinations used in arbuscular mycorrhizal research. Above the figure, molecular markers of nuclear ribosomal RNA are shown – small subunit (SSU), large subunit (LSU), 5.8S intergenic spacer (IGS) and internal transcribed spacer (ITS) are shown. Triangles show priming site and direction (according to Stockinger, 2010).

Ribosomska RNK (rRNK) je v posamezni spori AM gliv zelo polimorfna, kar pomeni, da so DNK sekvence rRNK gena med posameznimi taksoni AM gliv močno variabilne (Tisserant in sod., 2013). Dokazano je tudi, da imajo AM glive večjedrne hife, ki vsebujejo na stotine jeder (Tisserant in sod., 2013). Zaradi polimorfizma trenutno razpoložljivih genskih markerjev je vrsto AM gliv težko določiti z molekulskimi metodami. V večini okoljskih študij združb AM gliv te identificiramo kot skupine sorodnih sekvenc (npr. molekulske operativne taksonomske enote – MOTU), ki pa ne ustrezajo nivoju posamezne vrste AM gliv, ampak verjetno bolj ustrezajo posameznim rodovom (npr. Krüger in sod., 2009b). V nekaterih novejših študijah so uporabili tudi začetne oligonukleotide, ki pokrivajo vse regije jedrne ribosomske RNK (LSU, SSU in ITS; preglednica 1), in

omogočajo identifikacijo AM gliv na nivoju vrste (npr. Krüger in sod., 2009b). Te skupine sekvenc potem ustrezajo morfotipom AM gliv. Baza objavljenih podatkov teh sekvenc (baza National Center for Biotechnology Information – NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), kjer lahko iščemo z uporabo iskalnega algoritma BLAST tudi samo izolirane AM glive, je zaenkrat še relativno majhna in zato ne omogoča primerjave različnih okoljskih študij med seboj; predvsem množice tistih, kjer so bile v preteklosti uporabljene druge regije (ITS in LSU > 70 objav, Öpik in sod., 2013). Največ okoljskih raziskav (> 170 objav, Öpik in sod., 2013) diverzitete AM gliv je bilo izvedenih s pomnoževanjem SSU regije (npr. Schwarzott in Schußler, 2001; Helgason in sod., 2002; Husband in sod., 2002; Vandenkoornhuyse in sod., 2002; Öpik in sod., 2006) tudi z uporabo pirosekvenciranja 454 GS-FLX (npr. Öpik in sod., 2009; Dumbrell in sod., 2011). Ko rezultati filogenetske študije pokažejo, da sekvenca pade znotraj klastra sekvenc z definiranim morfotipom, jo lahko identificiramo precej zanesljivo. To pa je možno samo, ko imamo na voljo dovolj klonskih sekvenc iz izolata definirane morfotipa (Redecker in sod., 2003). Trenutno poznamo 252 morfotipov AM gliv, določenih na podlagi morfologije spor (<http://schuessler.userweb.mwn.de>; 14. 1. 2014). Na podlagi molekularnih analiz pa lahko ocenimo, da je to število v okolju bistveno večje in znotraj baze MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) vsebuje 341 virtualnih taksonov (Öpik in sod., 2013). Baza MaarjAM (Öpik in sod., 2010) je največja internetna baza s sekvencami AM gliv, ki izvirajo iz ekoloških študij o diverziteti AM gliv iz okoljskih vzorcev in taksonomskih raziskav, ki temeljijo na izoliranih AM glivah. Omogoča nam klasifikacijo sekvenc rRNA genov AM gliv z uporabo virtualnih taksonov, implementiranih znotraj baze MaarjAM (Öpik in sod., 2010). Klasifikacija sekvenc genov rRNA z uporabo virtualnih taksonov, ki so določeni na podlagi baze MaarjAM (Öpik in sod., 2009, 2010), nam omogoča poenoten sistem poimenovanja filotipov SSU rRNA, ki jih lahko v ekoloških študijah uporabimo za najboljši približek identifikaciji do vrst (Öpik in sod., 2013).

2.2.1.3 Diverziteta in sestava združb AM gliv

Molekularne raziskave so pokazale veliko taksonsko pestrost AM gliv v naravnih ekosistemih (Öpik in sod., 2006, 2010; Dumbrell in sod., 2011), vendar so osredotočene predvsem na raznolikost AM gliv v povezavi z vrsto gostiteljske rastline in so prezrle vpliv drugih okoljskih dejavnikov, ki lahko vplivajo na sestavo združb AM gliv (npr. Helgason in sod., 2002). AM glive so zaradi široke micelijske mreže v tleh močno podvržene vplivu abiotičnih okoljskih dejavnikov (Dumbrell in sod., 2010a; Maček in sod., 2011). Z razvojem molekularnih metod za identifikacijo AM gliv (npr. Helgason in sod., 1998; Lee in sod., 2008; Dumbrell in sod., 2011; Krüger in sod., 2012), predvsem novih generacij visokozmogljivega paralelnega sekvenciranja (Dumbrell in sod., 2011) se je povečalo naše poznavanje diverzitete talnih mikroorganizmov (npr. Schloss, 2009; Lemos in sod., 2011),

kar sedaj omogoča lažjo in natančnejšo karakterizacijo mehanizmov, ki strukturirajo združbe mikroorganizmov v okoljskih vzorcih.

Da bi razumeli, kaj vpliva na strukturo združb AM gliv v okolju in tudi napovedovali njihov razvoj, je potrebno odkriti splošne zakonitosti oz. pravila, po katerih se taksoni AM gliv razvrstijo v združbi (Weiher in Keddy, 1995). Pri tem je pomembna tako sama struktura novonastalih združb kot tudi pogostnost oz. abundanca vsake od prisotnih vrst (povzeto po Eler, 2007). Poznamo dve glavni teoriji, ki opisujeta procese, ki strukturirajo naravne združbe; teorija ekoloških niš in nevtralna teorija. Teorija ekoloških niš osvetljuje pomen determinističnih procesov (npr. pH tal, hipoksija), medtem ko nevtralna teorija biodiverzitet poudarja stohastične, tj. v veliki meri naključne procese (npr. Dumbrell in sod., 2010a). Teorija ekoloških niš predvideva delovanje različnih ekoloških filtrov, ki iz regionalnega vrstnega fonda na podlagi ekoloških zahtev vrste in medsebojnih odnosov med vrstami izločijo tiste, ki so znotraj posamezne ekološke niše najbolj kompeticijsko uspešne. Pri tem teorija pojmuje ekološke niše kot produkte izključevanja določenih znakov vrst, zaradi katerih je posamezna združba organizmov uspešna v eni funkcionalni lastnosti, slabša pa zato v ustrezni drugi, prav tako pomembni za preživetje vrste in ohranjanje velikosti njene populacije (povzeto po Eler, 2007). Po teoriji ekološke niše na strukturiranje združbe in njeno vrstno sestavo delujeta torej simultano dve nasprotujoči si sili. Na eni strani različni ekološki filtri, od najbolj grobih, klimatskih, talnih in topografskih do finejših na lokalnem nivoju (motnja), selekcionirajo čim bolj ekološko podobne vrste in zmanjšujejo funkcionalno pestrost združbe. Na drugi strani pa je med vrstami, ki uspejo preiti te abiotične filtre, kompeticija tem močnejša, čim ekološko sorodnejše so (skrajno velika je znotrajvrstna kompeticija), kar vpliva na obraten proces – izginjanje manj kompetitivnih vrst kljub njihovi ekološki primernosti za dane abiotične razmere (povzeto po Eler, 2007).

Če teorija niše predpostavlja, da je združba strukturirana, da vsaka vrsta zasede določen segment v hiperprostoru ekoloških dejavnikov in da je prekrivanja med vrstami karseda malo, postavi nevtralna teorija kot svoje izhodišče naslednjo trditev: vse vrste istega trofičnega nivoja so ekološko enakovredne, kar pomeni, da je prekrivanje niš v ekološkem hiperprostoru praktično stoddostno (povzeto po Eler, 2007). Nevtralna teorija je nastala kot posledica dejstva, da teorija ekološke niše v določenih segmentih ne pojasnjuje vzorcev v naravi dovolj dobro, oz. se napovedi modela niše mnogokrat ne skladajo z realnim stanjem (povzeto po Eler, 2007; Dumbrell in sod., 2010a).

Če splošno teorijo prenesemo na združbe AM gliv, nevtralna teorija predvideva, da bo na spremembe v sestavi združbe AM gliv pomembno vplivala geografska razdalja med vzorci, kot posledica omejitve pri širjenju organizmov, in da bo abundanca vrst sledila zero-sum multinomialni (ZSM) porazdelitvi (McGill in sod., 2006). Nevtralna teorija tudi predvideva, da ne bo nobene povezave med sestavo AM združb in identiteto gostiteljske rastline ali karakteristikami talnih parametrov (Dumbrell in sod., 2010a). Na drugi strani,

teorija niš predvideva, da se bodo razlike v sestavi združbe AM gliv spreminjale v odvisnosti od identitete gostiteljske rastline ali lastnosti talnih parametrov (npr. pH ali hipoksije) ter da bo krivulja abundance vrst sledila lognormalni ali drugačni, za ekološke niše značilni porazdelitvi abundance vrst. Teorija niš tako predvideva, da sestava združbe AM gliv ne bo pod vplivom geografske razdalje med vzorci, temveč bodo na spremembe v sestavi združbe primarno vplivali okoljski dejavniki (Dumbrell in sod., 2010a).

V raziskavi, kjer so vzdolž gradienta pH na območju Hetchell Wood (VB) analizirali združbo AM gliv v koreninah 425 posameznih rastlin, ki so pripadale 28 rastlinskim vrstam, so Dumbrell in sod. (2010a) raziskovali, kateri od zgoraj naštetih mehanizmov najbolje opisuje sestavo in strukturo združb AM gliv. Čeprav so Dumbrell in sod. (2010a) našli dokaze, da tako mehanizmi, ki temeljijo na teoriji niš, kot mehanizmi, ki temeljijo na teoriji nevtralnih procesov, vplivajo na strukturo združb AM gliv, so bili dokazi v prid mehanizmom na podlagi teorije niš. Ta je pokazala, da diferenciacija niš temelji na vplivu abiotskih dejavnikov okolja, predvsem pH reakcije tal, z zanemarljivim vplivom identitete gostiteljskih rastlin. Njihova študija je tudi pokazala, da se sestava združbe AM gliv še vedno predvidljivo odziva na glavne abiotske dejavnike v tleh, kljub temu, da je v naravnem okolju pod vplivom stohastičnih procesov (nevtralna teorija). Slednje osvetljuje pomen determinističnih procesov (teorija ekoloških niš) pri strukturiranju združb AM gliv v različnih kopenskih ekosistemih.

Pomen determinističnih in stohastičnih procesov je bil opisan tudi v študiji Dumbrell in sod. (2011), kjer so raziskovali dinamiko sestave združb AM gliv v različnih obdobjih tekom leta. Ugotovili so, da se na raziskovanem območju tvorita dve značilni združbi AM gliv, poletna in zimska, kar je posledica sezonske niše posameznih taksonov AM gliv. Ugotovili so, da se poletna združba AM gliv minimalno spreminja v sestavi. Morebitne spremembe v združbi znotraj tega obdobja so torej lahko posledica determinističnih odzivov AM gliv na lokalne abiotske talne dejavnike. Dodatno so dokazali, da se izenačenost in diverziteti združbe AM gliv zmanjšujeta od zimske do poletne združbe, ko se zaloga ogljika povečuje. To pa se kaže tudi v prevladi enega taksona AM gliv v poletnih združbah, ki nastane kot posledica stohastičnih procesov (Dumbrell in sod., 2010b, 2011). Tekom zime je na voljo manj svetlobe za vršenje fotosinteze, s čimer se manjša tudi zaloga virov ogljika za rast in razvoj AM gliv. To vpliva na strukturo združbe AM gliv in zmanjšuje pojav dominance posameznih taksonov v združbi AM gliv. Spomladi se na hitro poveča dotok ogljika prek rastline do AM gliv. Tekom rastne dobe rastlin je tako AM glivam na voljo vedno večja količina ogljika, ki omogoča hitro rast določenim taksonom AM gliv (znotraj nabora AM gliv, ki se pojavljajo znotraj določene ekološke niše), torej tistim, ki prvi dobijo večji dotok teh asimilantov. Ta stohastični vzorec, ki določa sestavo združb AM gliv, se pogosto kaže tudi v dominanci posameznih taksonov AM gliv (Dumbrell in sod., 2010b) znotraj združbe.

2.2.1.4 Biogeografija AM gliv

V primerjavi z biogeografijo makroorganizmov je biogeografija mikroorganizmov slabše raziskana (Fitter, 2005), čeprav se je z uporabo molekularnih metod razumevanje mikrobne biogeografije že izboljšalo (Martiny in sod., 2006; Prosser in sod., 2007; Ramette in Tiedje, 2007; Nemergut in sod., 2011). Na splošno velja, da mikrobna biogeografija sledi Baas-Backingovi hipotezi, ki pravi »vse je povsod, okolje izbira« (Baas-Backing, 1934), kar natančneje pomeni, da mikroorganizmi niso prostorsko omejeni in da na izoblikovanje mikrobne združbe vpliva lokalno okolje. Nedavne raziskave kažejo, da so biogeografski vzorci mikrobne združbe bolj kompleksni, kot predlaga Baas-Backingova hipoteza.

V več študijah poročajo, da lahko rastline iste vrste, ki se sočasno pojavljajo na enem območju, gostijo različne združbe AM gliv (Helgason in sod., 2002; Vandenkoornhuyse in sod., 2002, 2003; Sýkorová in sod., 2007; Öpik in sod., 2009). V teh študijah se ponavadi osredotočajo na združbo AM gliv v rastlinah iste vrste samo iz enega ali dveh območij. Iz tega je težko sklepati, ali razlika v združbi AM gliv med rastlinami iste vrste odraža samo lokalne preference gostitelja ali lahko ta pojav opazimo tudi na večji prostorski skali (Sýkorová in sod., 2007). Kivlin in sod. (2011) poročajo o značilnem vplivu vrste gostiteljskih rastlin in klimatskega območja na sestavo združb AM gliv, medtem ko Öpik in sod. (2013) poročajo o vplivu različnih klimatskih območij tako med kot znotraj kontinentov na sestavo združbe AM gliv. Njihovi rezultati kažejo na vpliv biogeografije in na vpliv okoljskih dejavnikov na variabilnost v sestavi združb AM gliv na globalni skali, kar potrjuje raziskavo Öpik in sod. (2010). Rezultati Moora in sod. (2011) so potrdili rezultate Öpik in sod. (2009, 2010), da rastlinski generalisti, kamor spadajo tudi invazivne rastline, pogosto najdejo glivne partnerje med geografsko razširjenimi generalisti. Van der Gast in sod. (2011) poročajo, da na prostorske vzorce AM gliv vpliva geografska oddaljenost in različna raba zemljišča, tako na lokalni ravni kot preko celotnega analiziranega območja (razdalja najbolj oddaljenih vzorčnih lokacij je bila 250 km). Hazard in sod. (2013) so na 40 geografsko različnih lokacijah ocenjevali razlike v sestavi združb AM gliv pri plazeči detelji (*Trifolium repens* L.) in trpežni ljujki (*Lolium perenne* L.). Študija je bila izvedena na Irskem na različnih tipih tal in območjih z različno rabo tal. Ugotovili so, da je sprememba v združbi AM gliv odvisna od abiotičnih dejavnikov v tleh, torej pH, padavin in tipa tal, in ne od različne rabe tal ali geografske oddaljenosti, kar podpira Baas-Backingovo hipotezo.

Meta analize o vplivu različnih habitatov, klimatskih območij in gostiteljskih rastlin na geografijo AM gliv so postale lažje z objavo baze MaarjAM, dostopne na <http://maarjam.botany.ut.ee> (Öpik in sod., 2010), ki poleg sekvenc AM gliv iz različnih ekoloških študij vsebuje tudi pripadajoče meta podatke.

2.2.1.5 Raziskave arbuskularne mikorize na območjih mofet

O dolgoročnem vplivu naravno povečane koncentracije CO₂ na kolonizacijo korenin z arbuskularno mikorizo ni veliko raziskav. Kolonizacijo korenin z AM glivami pri rastlinah iz območja naravnih izvirov CO₂ v Stavešincih je leta 2003 prva preučevala dr. Irena Maček v svoji doktorski disertaciji (Maček, 2004; Maček in sod., 2012). Ugotovili so, da so korenine rastlin, vzorčene enakomerno iz prostorske mreže z resolucijo 1 m, kolonizirane tudi na območjih s koncentracijo CO₂ do 37 % v talnem zraku, vendar povezave med kolonizacijo korenin z AM glivami in koncentracijo CO₂ niso ugotovili (Maček in sod., 2012). Poročajo tudi, da povečana koncentracija CO₂ ni značilno vplivala na odstotek kolonizacije korenin z AM glivami pri sejani koruzi na območju travniških mofet v okolici Stavešincev (Maček, 2004). O kolonizaciji korenin z AM glivami na območjih z različnim režimom CO₂ poroča tudi Kosi (2012), ki je v svojem diplomskem delu ocenjeval kolonizacijo korenin rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.) na območju čeških mofet v okolici Cheba. Značilnih razlik pri oceni kolonizacije med območji z različno talno koncentracijo CO₂ ni bilo, saj so bile korenine rušnate masnice mikorizirane tudi na območjih visoke talne koncentracije CO₂. Na območju travniške mofete v Stavešincih je bila kolonizacija korenin posameznih rastlinskih vrst podrobneje analizirana tudi leta 2007 (Maček in sod., 2011). Analiza je pokazala statistično značilne razlike med kolonizacijo korenin z območij z ekstremno visoko (> 400 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji za štiri rastlinske vrste (sivozelena muhvič – *Setaria pumila* (Pior.) Roem & Schult, navadna kostreba – *Echinochloa crus-galli* (L.) PB, ozkolistni trpotec – *Plantago lanceolata* L. in navadna latovka – *Poa pratensis* L.).

Poročil o molekularnih analizah združb AM gliv in njihovi diverziteti iz območja naravnih izvirov CO₂, mofet, z izjemo študije Maček in sod. (2011), ni. Maček in sod. (2011) poročajo o veliki beta diverziteti, kar kaže na različno sestavo združb AM gliv med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji. Dodatno poročajo tudi o številčni prevladi dveh specializiranih taksonov AM gliv v hipoksičnih tleh. Njihovo delo kaže, da so abiotski talni delavniki (povečana koncentracija CO₂ in posledično inducirana hipoksija) glavni dejavniki, ki vplivajo na sestavo združb AM gliv na mofetah in na njihov filogeografski vzorec. Posledično so dokazali tudi, da je sestava združb AM gliv bolj odvisna od sprememb v okolju kot pa od identitete gostiteljskih rastlin (Maček in sod., 2011). Za predmetno študijo so bile korenine vzorčene v času od junija do avgusta v letu 2007, vendar posamezni termini vzorčenja niso bili zajeti v analizo podatkov. Raziskave sestave združb AM gliv tekom leta ali celo znotraj posamezne rastne sezone so redke in večinoma ne vključujejo zimskega obdobja. Ena redkih izjem je študija Dumbrell in sod. (2011), kjer so ugotovili, da je poletna združba AM gliv manj izenačena in ima manjšo diverziteti kot zimska združba iz istega območja. Prav tako so ugotovili, da se poletna združba minimalno spreminja v sestavi tekom rastne dobe rastlin in da so morebitne spremembe v združbi znotraj tega obdobja lahko le posledica determinističnih odzivov AM

gliv na lokalne abiotske talne dejavnike. Podoben pojav opazimo tudi pri raziskavi Maček in sod. (2011), kjer je beta diverziteta znotraj poletne združbe pokazala dve različni združbi AM gliv (združbo AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in združbo AM gliv s kontrolnih območij), kar pa je lahko le posledica vpliva abiotskih dejavnikov na območjih mofet (predvsem talne hipoksije), ki kaže na specifičnost okoljske niše z različnim plinskim režimom. Raziskav sestave združb AM gliv med različnimi leti po nam znanih podatkih ni, smo pa v predmetno doktorsko disertacijo vključili tako raziskave vpliva talnih dejavnikov na sestavo združb AM gliv med različnimi meseci tekom rastne dobe (med mesecem aprilom in mesecem oktobrom) kot tudi med dvema zaporednima rastnima dobama (v letu 2010 in v letu 2011). Dodatno smo v raziskavo vključili tudi območja geografsko oddaljenih mofet, v Republiki Češki in mofeto Bossoleto v Italiji, saj smo želeli preučiti tudi vpliv abiotskih dejavnikov na sestavo združb AM gliv tudi na večji prostorski skali.

2.2.2 Arheje in bakterije

Tla predstavljajo okolje z največjo biotsko diverzitetjo, ki lahko presega nadzemno diverzitetjo za več velikostnih razredov. Velik del talne diverzitetje predstavlja diverzitetja prokariotov, bakterij in arhej. Študij, ki bi se osredotočile na vpliv povečane koncentracije talnega CO₂ na spremembe v združbi talnih mikroorganizmov, je malo (preglednica 2).

Na območju travniških mofet v okolici Stavešincev so Maček in sod. (2009) prvi poročali o manjšem SIR (s substratom induciranim dihanjem) v tleh. Rezultati njihove raziskave kažejo na manjšo mikrobno biomaso in manjšo mikrobno aktivnost v tleh, ki so izpostavljena visokim koncentracijam CO₂ geološkega izvora. Številčnost in raznolikost genov *cbbl*, ki kodirajo veliko podenoto RuBisCO pri bakterijah, so preučevali Videmšek in sod. (2009). Opazili so manjše število kopij *cbbl* genov (avtotrofnih, CO₂-fiksirajočih bakterij) v tleh na območju z največjimi koncentracijami CO₂ v primerjavi s kontrolnim območjem. Dodatno poročajo tudi o razliki med diverzitetjo združb avtotrofnih, CO₂-fiksirajočih bakterij med območjem z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnim območjem. Ugotovili so, da se lahko samo del avtotrofnih, CO₂-fiksirajočih bakterij prilagodi na zelo visoke koncentracije CO₂, kar jim omogoča preživetje v teh neugodnih razmerah na območju mofet.

V študijah o talnih bakterijah na območjih mofet poročajo večinoma o zelo specifičnih funkcionalnih vprašanjih glede kroženja ogljika v teh sistemih, kar je povezano z uporabo mofet kot modelnega sistema za preučevanje vplivov uhajanja CO₂ iz sistemov za zajem in shranjevanje CO₂ (sistemi CCS). V okolici Laacher See (Nemčija) so Krüger in sod. (2009a, 2011) raziskovali vpliv povečane koncentracije CO₂ na mikrobne združbe v tleh. Poročajo o manjšem številu anaerobnih bakterijskih celic in večjem številu arhejskih celic na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Novejša študija o pogostnosti različnih

funkcionalnih in specifičnih genskih markerjev na območju teh mofet je pokazala razlike v sestavi talnih mikrobnih združb, npr. zmanjšano prisotnost predstavnikov iz rodu *Geobacteraceae* in povečano število sulfat reducirajočih taksonov v središču izvirov CO₂ (Frerichs in sod., 2013). Na območju druge evropske mofete, Latere Caldera v centralni Italiji, Beaubien in sod. (2008) poročajo o manjši biomasi adenzin trifosfata (ATP), manjšem številu bakterijskih celic in večji aktivnosti striktno anaerobnih sulfat reducirajočih bakterij in metanogenih arhej na območjih z visoko koncentracijo CO₂ v primerjavi s kontrolnimi območji. Dodatno, iz tega območja Oppermann in sod. (2010) poročajo o prisotnosti metanogenih arhej, *Geobacteraceae* in sulfat reducirajočih bakterij na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Vsi ti rezultati kažejo na spremembe v sestavi mikrobnih združb v smeri večjega števila predstavnikov anaerobnih in acidofilnih mikroorganizmov, kot posledica dolgotrajne izpostavljenosti tal visokim koncentracijam CO₂.

Iz območja Mammoth Mountain na vzhodu Kalifornije (ZDA) pa avtorji (McFarland in sod., 2013) v nedavni publikaciji poročajo o manjši mikrobnii biomasi na območjih s povečano koncentracijo CO₂, in spremembi v populaciji arhej med območji z različno koncentracijo CO₂.

Glede na razpoložljivo literaturo pa še vedno pogrešamo podrobnejšo filogenetsko karakterizacijo arhejskih in bakterijskih združb z območij mofet ter razumevanje procesov, ki uravnavajo njihovo diverzitetu in strukturo. V naši študiji, izvedeni na območju travniške mofete v okolici Stavešincev, Šibanc in sod. (2014) poročamo o spremembi sestave združb arhej in bakterij v smeri večje abundance anaerobnih in metanogenih predstavnikov na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Spremembe v sestavi združb arhej in bakterij imajo lahko velik vpliv na funkcionalnost ekosistema (npr. spremembe v kroženju ogljika kot posledica sprememb v populaciji metanogenih arhej), zato je razumevanje njihovih odzivov na dolgotrajne okoljske spremembe bistvenega pomena v ekosistemskih študijah (Šibanc in sod., 2014). Metode dela in rezultati omenjene objave so podrobneje predstavljeni v doktorski disertaciji v poglavjih 3.4 in 4.3.

2.2.3 Kvasovke

Glive predstavljajo pomemben delež mikrobne biomase tal (Ekelund in sod., 2001). So pomembna komponenta diverzitetu talnih mikroorganizmov (Fierer in sod., 2007). Morfološko delimo glive na makroskopske, filamentozne in enocelične kvasovke (Domsch in sod., 2007). Kvasovke so heterogena in polifiletska skupina. Uvrščamo jih predvsem v debli Ascomycota in Basidiomycota, pojavljajo pa se tudi v dimorfni obliki (rast v obliki kvasnih celic in hif) v deblu Zygomycota (Botha, 2011). Spolno razmnoževanje pri askomicetnih kvasovkah je mejoza, kjer poteka tvorba haploidnih askospor v asku (Botha, 2011). Poznamo štiri načine enocelične nespolne rasti: z brstenjem, nastankom prečnih

sten, izstrelitvijo balistokonidijev in razpadom hif na mestih novonastalih sept (Botha, 2011).

Kvasovke so zelo razširjene, saj kolonizirajo različna okolja od kopenskih ekosistemov, zračnih in vodnih okolij kot tudi površino sadja, zelenjave, cvetov (Rodrigues in sod., 2006). Najdemo jih tudi v ekstremnih okoljih, npr. v arktičnem ledu (Gunde - Cimerman in sod., 2003; Butinar in sod., 2007), v tleh na Antarktiki (Connell in sod., 2008) in na solinah (Gunde - Cimerman in sod., 2000; Butinar in sod., 2005). Čeprav raziskave o kvasovkah v tleh potekajo že skoraj stoletje (Yurkov in sod., 2012), njihova ekološka funkcija v tleh še ni čisto pojasnjena. Vpliv abiotskih in biotskih dejavnikov na talne kvasovke je v preglednem članku opisal Botha (2011). Talne kvasovke vplivajo tako na rast talnih mikroorganizmov kot na rast rastlin in vplivajo na strukturiranje talnih agregatov in strukturo tal. Delujejo kot vir hranil za bakterijske plenilce in druge plenilce talne favne, prispevajo k mineralizaciji organskega materiala in razgradnji ogljika. Nekatere kvasovke vplivajo na dušikov in žveplov cikel in so sposobne raztapljanja fosfatov do rastlinam dostopnih oblik. Lastnosti in struktura talnega habitata imata tako pomemben vpliv na diverzitetu talnih kvasovk (povzeto po Botha, 2011). V naravnih okoljih imajo kvasovke širok izbor virov ogljika za svojo rast (npr. alkohole, organske kisline, aminokisline), vendar prednostno presnavljajo sladkorje (Rodrigues in sod., 2006).

Kvasovke fiziološko klasificiramo na podlagi procesov proizvodnje energije pri presnovi sladkorjev na nefermentativne, fakultativno in obligatno fermentativne (van Dijken in Scheffers, 1986). Nefermentativne kvasovke presnavljajo samo z dihanjem in niso sposobne alkoholne fermentacije glukoze (npr. *Rhodotorula glutinis*), medtem ko so obligatno fermentativne kvasovke sposobne presnavljati glukozo samo preko alkoholne fermentacije (npr. *Candida slooffiae*) (Rodrigues in sod., 2006). Večina fakultativno fermentativnih kvasovk se prilagaja ravnim razmeram, tipu in koncentraciji sladkorja in razpoložljivega kisika in lahko presnavlja samo z dihanjem ali s fermentacijo ali z obema hkrati (npr. *Saccharomyces cerevisiae*).

Glavna okoljska dejavnika, ki močno vplivata na presnovno fiziologijo kvasovk, sta torej sestava sladkorjev in količina razpoložljivega kisika. Poznamo tri učinke, ki so povezani s proizvodnjo energije pri procesih, vključenih v presnovo sladkorjev v povezavi z razpoložljivostjo kisika (Rodrigues in sod., 2006). To so Pasteurjev učinek, Crabtreejev učinek in Custerjev učinek. **Pasteurjev učinek** je definiran kot inhibicija alkoholne fermentacije ob prisotnosti kisika in poteka na dva načina (Stickland, 1956). Prisotnost kisika lahko delno ali popolnoma zavre tvorbo produktov anaerobnega razpada ogljikovih hidratov (npr. glukoze). Lahko pa kisik le zmanjša stopnjo razpada ogljikovih hidratov (Stickland, 1956). Pri večjih koncentracijah glukoze Pasteurjev učinek nima vpliva, saj takrat poteka le fermentacija. **Crabtreejev učinek** je definiran kot alkoholna fermentacija v aerobnih razmerah (Pronk in sod., 1996). Presnova glukoze je odvisna od koncentracije glukoze v okolici. Pretvorba glukoze do etanola v aerobnih razmerah je pri nizkih

koncentracijah glukoze zelo počasna in omejuje tvorbo zadostne količine energije. Z naraščanjem koncentracije glukoze v okolici narašča tudi stopnja aerobne pretvorbe glukoze v etanol. Pri koncentraciji glukoze, večji od 3 %, se stopnja aerobne presnove glukoze zelo poveča v eksponentni fazi rasti, obenem pa se stopnja dihanja zmanjša (De Deken, 1966, povzeto po Vozel, 2012). **Cousterjev učinek** je poznan kot zaviranje alkoholne fermentacije ob odsotnosti kisika. Učinek je dobro opisan pri kvasovkah, ki spadajo v rodova *Brettanomyces* in *Dekkera*, kjer poteka fermentacija glukoze v etanol in očetno kislino v aerobnih razmerah (Rodrigues in sod., 2006). Ob spremembi v anaerobno okolje je fermentacija močno upočasnjena, vendar se ob povečanju kisika zopet vzpostavi.

Čeprav je sposobnost, da fermentirajo glukozo pod omejenimi viri kisika, pogosta lastnost kvasovk, se izkaže, da njihova rast v anaerobnih razmerah ni pogosta (Visser in sod., 1990). Znano je, da lahko fakultativni anaerobi rastejo tako v aerobnih kot anaerobnih razmerah tako, da uporabljajo molekularni kisik ali drugo spojino kot končni sprejemnik elektronov anaboličnih procesov (Rodrigues in sod., 2006). Fakultativno anaerobni mikroorganizmi, kamor spadajo tudi kvasovke, fermentirajo tudi v aerobnih razmerah, bolj značilna pa je fermentacija v anaerobnem okolju. Stranski produkt procesa fermentacije je tudi CO₂, katerega lahko kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proizvedejo v uri in pol tudi od 400 do 850 ppm (Smallegange in sod., 2010). Prav zaradi lastnosti pridobivanja CO₂, s katerim lokalno ustvarjajo tudi lastno atmosfero s povečano koncentracijo tega plina, predpostavljamo, da so sposobne preživeti tudi v specifičnem okolju, kot so območja mofet. Znanstvenih objav o vplivu povečane koncentracije CO₂ na rast in diverzitetu kvasovk v tleh nismo zasledili.

2.2.3.1 Identifikacija kvasovk z območja mofet

Taksonomija in filogenija kvasovk temeljita na primerjalnih analizah morfoloških, ontogenetskih in biokemijskih podatkov (Hawksworth, 1991). Identifikacija kvasovk temelji večinoma na morfoloških znakih, za kar je potrebna gojitev na gojišču. Pomembne značilnosti kulture so barva, oblika in struktura kolonij in prisotnost izvenceličnega polisaharidnega materiala. Za prepoznavo se uporablja različne znake, med katerimi sta najpomembnejša vrsta konidijev in konidiogeneza (proces tvorbe konidijev). Uporabljajo se tudi znaki, kot so oblika vegetativnih celic in prisotnost specifičnih hifnih elementov (povzeto po Kranjec, 2008). Številne glive kvasovke rastejo relativno hitro v čisti kulturi, tako da je za prepoznavo in določevanje možno uporabiti tudi fiziološke in biokemijske tehnike (Guarro in sod., 1999). Testi, ki temeljijo na fizioloških metodah, se poslužujejo razlik v rasti gliv pri različnih temperaturah, vrednostih pH in parcialnem tlaku kisika. Med biokemijske tehnike štejemo vse od preprostega gojenja na agarnih ploščah – uporaba različnih tipov gojišč – do kompleksnih kromatografskih in elektroforeznih metod (Guarro in sod., 1999). Uporabljamo jih kot pomoč pri določevanju vrst, osnovanih na podlagi morfoloških lastnosti, kjer se pojavljajo omejitve v morfološkem konceptu vrste.

Razširjena je tudi uporaba asimilacijskih testov API 20 C AUX za identifikacijo kvasovk (Guarro in sod., 1999). Prepoznavna vrst kvasovk s pomočjo morfoloških znakov je pogosto močno omejena; zato se vzporedno z morfološkimi znaki za prepoznavo oz. identifikacijo uporabljajo fiziološke in biokemijske tehnike. Za razliko od njih so molekulske tehnike splošno uporabne (Guarro in sod., 1999), saj so genotipski znaki prisotni povsod in so neodvisni od ekspresije (povzeto po Kranjec, 2008).

Zlata doba molekulske glivne sistematike se je začela z razvojem tehnik določevanja nukleotidnega zaporedja DNK in RNK in računalniških programov, ki uporabljajo nukleotidna zaporedja za določevanje filogenetskih odnosov med organizmi (povzeto po Kranjec, 2008). V zadnjih letih je bil sistem klasifikacije kvasovk kot tudi ostalih gliv prenovljen z uporabo molekulskih analiz nukleotidnih zaporedij, ki se tekom evolucije niso toliko spreminjala, kot na primer rRNK gen. Prvo nukleotidno zaporedje, ki so ga v večji meri uporabili pri teh študijah, je bilo zaporedje DNK ribosoma, in sicer 5S rRNK. Kasneje so v filogenetske študije vključili tudi nukleotidni zaporedji rRNK gena male in velike podenote ribosoma; 18S in 26S rRNK (povzeto po Kranjec, 2008).

Pri kvasovkah se uporabljata izključno regiji D1 in D2 26S rDNK, ki predstavljata identifikacijski standard pri določevanju kvasovk. Kodirajoče regije ribosomske RNK (preglednica 1) so zaradi letalnosti večine mutacij ohranjene s počasno evolucijo. 5'8S rRNK, del 26S rRNK in 18S rRNK so uporabni za oris višjih taksonomskih ravni, kot so razredi in debla (preglednica 1). Kurtzman in Robnett (1998) sta dokazala, da lahko večino vrst kvasovk določimo s pomočjo raznolikosti nukleotidnih zaporedij teh regij (povzeto po Kranjec, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

Za študijo biodiverzitet arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv, arhej, bakterij ter kvasovk smo izbrali travniško lokacijo naravnih izvirov CO₂ (**travniške mofete**) v okolici Stavešincev (slika 2 in slika 4), kjer smo med leti 2009 in 2011 vzorčili tla in korenine rastlin. Dodatno smo za raziskave vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na večji prostorski skali med leti 2008 in 2011 vzorčili korenine rastlin z AM glivami tudi na območju gozdnih izvirov CO₂ (**gozdne mofete**) na Stavešinskem vrhu (slika 2 in slika 5), imenovanih tudi Slepica ali Vrelci življenja, ter v letu 2008 na območju naravnih izvirov CO₂ v Bossoletu (slika 3 in slika 7), Italija (**italijanska mofeta**) in v okolici Cheba (slika 3 in slika 6), Češka (**češka mofeta**).

V nadaljevanju so na kratko predstavljeni sklopi raziskav, ki so potekali med leti 2008 in 2013 na območju naravnih izvirov CO₂. Podrobnejši opisi posameznih lokacij in načina vzorčenja so opisani v poglavjih 3.2, 3.3.1, 3.4.1 in 3.5.1.

1. Območje travniških mofet v okolici Stavešincev

a) Arbuskularne mikorizne (AM) glive

Na območju travniških mofet v Stavešincih smo ocenili kolonizacijo korenin z AM glivami. Korenine smo vzorčili s treh mofet, imenovanih Mofeta 1, Mofeta 2 in Mofeta 3 (glej sliko 8). Na vsaki izmed mofet smo vzorčili korenine z območja z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnega območja. Vzorčenje korenin je bilo izvedeno v aprilu, juniju, avgustu in oktobru leta 2010.

Izvedli smo tudi analizo sestave združb in biodiverzitet AM gliv v mešanih koreninskih vzorcih rastlin. Korenine smo vzorčili s treh mofet, imenovanih Mofeta 1, Mofeta 2 in Mofeta 3 (glej sliko 8). Na vsaki izmed mofet smo vzorčili korenine z območja z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnega območja. Vzorčenje korenin smo izvedli v aprilu, juniju, avgustu in oktobru leta 2010 in 2011.

b) Arheje in bakterije

Analizo sestave združb in biodiverzitet arhej in bakterij smo izvedli v vzorcih tal z območja z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in s kontrolnega območja. Vzorčenje tal je bilo izvedeno v novembru leta 2009.

c) Kvasovke

Na območju travniških mofet smo izvedli tudi analizo biodiverzitet kvasovk. Tla smo vzorčili z območja z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnega

območja. Vzorčenje tal smo izvedli v novembru leta 2009, istočasno kot vzorčenje za analizo biodiverzitete arhej in bakterij, in v juniju leta 2010.

2. Območje gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu

Na območju gozdnih mofet smo izvedli analizo sestave združb in biodiverzitete AM gliv v koreninah rastlin mešanih rastlinskih vzorcev. Vzorčili smo z območja z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnega območja. Vzorčenje korenin je bilo izvedeno v aprilu, juniju, avgustu in oktobru, leta 2010 in 2011.

3. Območje čeških mofet v okolici Cheba

Na območju čeških mofet smo izvedli analizo sestave združb in biodiverzitete AM gliv v koreninah rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). Vzorčili smo korenine rastlin z območij z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnih območij. Vzorčenje korenin je v maju leta 2008 izvedla dr. Irena Maček.

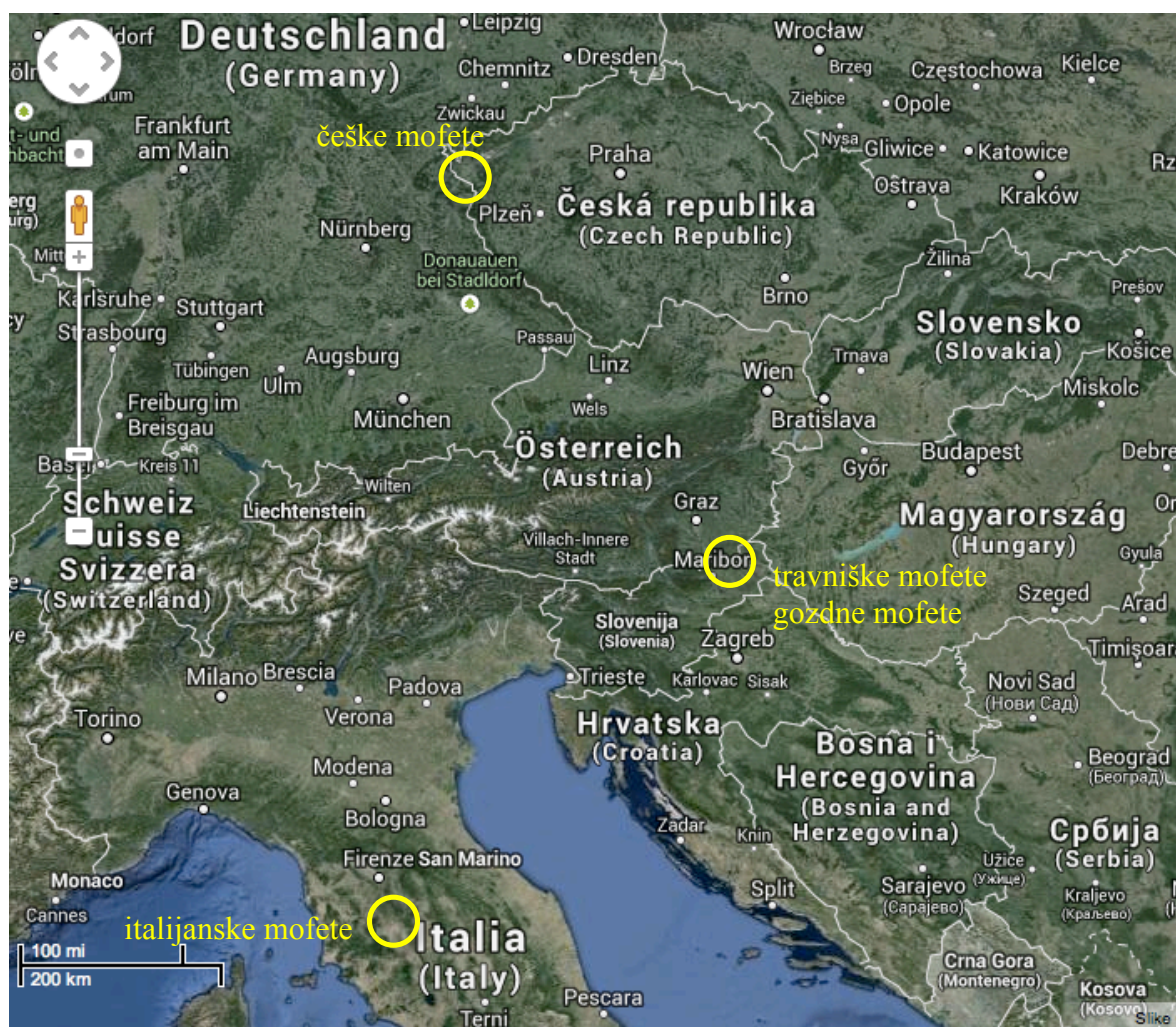
4. Območje italijanske mofete Bossoleto

Analiza sestave združb in biodiverzitete AM gliv je bila izvedena na vzorcih korenin plazeče šopulje (*Agrostis stolonifera* L.), ozkolistnega trpotca (*Plantago lanceolata* L.), navadnega trsta (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) in bleščečega glavinca (*Centaurea alba* L.). Rastline so bile vzorčene z območij z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnih območij. Vzorčenje korenin je v juniju leta 2008 izvedla dr. Irena Maček.



Slika 2. Lokacija travniških mofet v okolici Stavešincev in gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, Slovenija (vir posnetka: Google Maps)

Figure 2. The location of meadow mofettes near Stavešinci and forest mofettes at Stavešinski vrh, Slovenia (photo source: Google Maps)



Slika 3. Lokacije travniških, gozdnih, italijanskih in čeških mofet (vir posnetka: Google Maps).

Figure 3. The location of meadow mofettes, forest mofettes, Italian mofettes and Czech mofettes (photo source: Google Maps).

3.1 MERITVE KONCENTRACIJE TALNIH PLINOV IN PEDOLOŠKA ANALIZA TAL

Na zgoraj omenjenih lokacijah mofet smo vzorčili talne izvrtke, iz katerih smo izolirali DNK AM gliv iz korenin rastlin, izoliranih iz teh izvrtkov (natančno vzorčenje za segment AM glive je opisano v poglavju 3.3.1). Del tal iz izvrtkov smo posušili na 40 °C in shranili za pedološko analizo tal. Rezultate pedološke analize tal iz območja travniških mofet smo uporabili tudi pri raziskavah vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na sestavo združb arhej in bakterij. V tem primeru smo uporabili podatke z območij, ki so v neposredni bližini mest vzorčenja tal za analizo biodiverzitete arhej in bakterij (vzorčenje tal za segment arheje in bakterije je opisano v poglavju 3.4.1). Na enak način smo pridobili tudi pedološke podatke za raziskave biodiverzitete kvasovk (vzorčenje tal za segment kvasovke je opisano v poglavju 3.5.1).

Na območjih mofet (glej poglavje 3.2. za opise posameznih lokacij mofet) smo za identifikacijo mest vzorčenja, ki ustrezajo izbranim razredom koncentracij CO₂ v tleh, tj. okvirno < 2 % CO₂ (**kontrola**), 15–25 % CO₂ (**srednji CO₂**) in > 50 % CO₂ (**visok CO₂**), s talno sondo premera 2 cm v tla izvrtali luknjo do globine 20 cm. Takoj, ko smo sondo izvlekli, smo z izsesavanjem zraka s prenosnim analizatorjem plinov (GA2000+, Ansyco, Nemčija) v nastali luknji v tleh izmerili sestavo plinov v talni atmosferi. Če je izmerjena koncentracija CO₂ v tleh ustrezala izbranemu razredu koncentracij CO₂ (kontrola, srednji CO₂ ali visok CO₂), smo z večjo sondo (premera 10 cm) vzorčili talni izvrtok okoli mesta, kjer smo predhodno izmerili sestavo plinov. Analizator plinov omogoča tudi istočasne meritve koncentracij CO₂ in metana (CH₄) na podlagi infrardeče absorpcije plinov ter meritev koncentracij kisika (O₂), ogljikovega monoksida (CO) in vodikovega sulfida (H₂S) z notranjimi elektrokemijskimi celicami (Pfanž in sod., 2004; Vodnik in sod., 2006).

Pedološka analiza tal je bila izvedena na Centru za pedologijo in varstvo okolja, Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. pH reakcija tal je bila izmerjena v talni suspenziji v 0,01 M CaCl₂ (SIST ISO 10390, 2006). Skupni dušik (N) je bil izmerjen z metodo suhega sežiga (SIST ISO 13878, 1999). Lahko dostopni fosfor (P₂O₅) je bil izmerjen v AL raztopini (Egnér in sod., 1960) s kolorimetrično metodo (Kalra in Maynard, 1991). Vsebnost vode v tleh (WHC) smo določili gravimetrično iz razlike v masi med svežim vzorcem in vzorcem tal, ki smo ga 24 ur sušili na 105 °C.

Rezultate pedološke analize smo obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) ali s Kruskal-Wallisovim testom, ki je neparametrična različica ANOVE. Da bi lahko ugotovili, med katerimi podskupinami prihaja do statistično značilnih razlik, smo uporabili test mnogoterih primerjav (Tukey). Za statistične izračune smo uporabili programski jezik R verzije 3.0.1 s paketom Rcmdr (R Development Core Team, 2011).

3.2 OPIS LOKACIJ VZORČENJA

3.2.1 Travniški izviri CO₂ v okolici Stavešincev (travniške mofete)

Travniški izviri CO₂ v okolici Stavešincev (slika 2 in slika 4) so v dolini reke Ščavnice, v severovzhodnem delu Slovenije, ki je že od konca 19. stoletja poznan po naravni mineralni vodi Radenski. Območje je del tektonsko aktivnega panonskega bazena, kjer je večina geološkega CO₂ nastala v času pleiocenske in zgodnje pleistocenske post vulkanske aktivnosti (Pezdič in Žižek, 1993). Nastali CO₂ se je globoko v zemeljski skorji ujel v miocenske in pliocenske porozne sedimente, kjer je pod visokim tlakom (100 do 110 barov) ostal do danes (povzeto po Maček, 2004).

Lokacija vzorčenja je del ravninskega kmetijskega zemljišča. Obstoječo vegetacijo na območju mofet sestavljajo trave, travniška zelišča in nekatere ruderalne rastlinske vrste (Vodnik in sod., 2002a, 2002b; Pfanz in sod., 2007). V vegetacijski sestavi prevladujejo navadna pasja trava (*Dactylis glomerata* L.), travniška latovka (*Poa pratensis* L.), volnata medena trava (*Holcus lanatus* L.), navadno ločje (*Juncus effusus* L.), sivozelni muhvič (*Setaria pumila* (Pior.) Roem & Schult) in navadna kostreba (*Echinochloa crus-galli* (L.) PB) (Pfanž in sod., 2007). Na območjih z izhajanjem geološkega plina so zaradi ekstremnih razmer rastline manjše in vegetacija nižja, kar je tekom vegetacijske sezone jasno opazno (Pfanž in sod., 2004; Vodnik in sod., 2006).

Na preučevanem območju najdemo distrična oglejena antropogena tla na kvartarnih naplavinah z meljasto glinasto ilovnato teksturo, sestavljeno iz 9 % peska, 53 % melja in 38 % gline. Vsi talni horizonti (Ag-Br₁-Br₂) kažejo na redukcijske razmere, ki postajajo izrazitejše z globino tal in s povečevanjem koncentracije CO₂ v tleh (Videmšek in sod., 2009; preglednica 7 in preglednica 13).

Na območju travnika je več izvirov geološkega plina, kjer preko geoloških izvirov izhaja čisti CO₂, le s sledovi vodikovega sulfida (H₂S) in metana (CH₄) in brez prisotnosti ogljikovega monoksida (CO) (glej prilogo A). Neposredno ob izviri se pogosto pojavlja ekstremno visoka koncentracija CO₂ v tleh, ki doseže tudi do 99,9 % CO₂ v talnem zraku. Atmosferska koncentracija CO₂ se v višini travne vegetacije giblje med 0,036 in 1 %, vendar se lahko zaradi vremenskih razmer hitro spreminja (Maček, 2004). V letih 2002 in 2003 so bile na manjši ploskvi (60 m²) izvedene prostorske in časovne meritve talnih koncentracij CO₂ in O₂ (Vodnik in sod., 2006, 2009). Primerjave podatkov med posameznimi meritvami so pokazale, da so lokacije vrelcev in koncentracije geološkega CO₂ na območju mofet v okolici Stavešincev precej stabilne skozi daljša časovna obdobja.



Slika 4. Območje travniških mofet v okolici Stavešincev. Na sliki je prikazana mikrolokacija Mofeta 3, na levi strani so oznake za kontrolne lokacije z ambientalno koncentracijo CO₂, na desni strani so oznake lokacij z visoko koncentracijo CO₂.

Figure 4. Location of meadow mofettes near Stavešinci. Figure shows micro location of Mofette 3, on the left side with labels of locations for control samples with ambient CO₂ concentration, on the right side with labels of locations sampled for high CO₂ samples.

3.2.2 Gozdni izviri CO₂ na Stavešinskem vrhu (gozdne mofete)

Gozdni izviri CO₂ (slika 5) so približno 1,3 km severno od travniških izvirov na območju, imenovanem tudi Vrelci življenja ali Stavešinske slepice (slika 2). Izotopska sestava plinov in vpliv geološkega CO₂ na rast nekaterih rastlin (mahov, bora, smreke in vrbe) je bil iz tega območja opisan že leta 1998 (Pezdič in sod., 1998), kasnejših objav pa nismo zasledili. Za vegetacijo na območju je značilna prisotnost migaličnega šaša (*Carex brizoides* L.) in dvolistne senčnice (*Maianthemum bifolium* (L.) F. W. Schmidt).

Na območju vzorčenja sta dva izvira CO₂, napolnjena z vodo, ki kažeta vidne znake izhajanja CO₂. Prvi izvir (slika 5) je večji, manjši izvir pa je od prvega oddaljen 5 metrov.

Reakcija tal je na območju izvirov med pH 3,4 in 3,7. Koncentracija dostopnega fosforja je bila na območju z visoko koncentracijo CO₂ precej višja, in sicer med 37 in 97 mg/100 g suhih tal, medtem ko je bila na kontrolnem območju, ki je bilo 14 m južno, med 6 in 9

mg/100 g suhih tal. Prav tako smo določili večji razpon skupnega dušika v tleh, med 0,4 in 0,9 % na območju z visoko koncentracijo CO₂ in med 0,3 in 0,5 na kontrolnem območju. Natančnejši podatki o meritvah so predstavljeni v preglednici 10.



Slika 5. Gozdne mofete na Stavešinskem vrhu. Na sliki so prikazane tudi oznake vzorčnih mest za vzorce z visoko koncentracijo CO₂.

Figure 5. Forest mofettes at Stavešinski vrh. Figure shows labels for samples taken at high CO₂ concentrations.

3.2.3 Naravni izviri CO₂ na Češkem (češke mofete)

Naravni izviri CO₂ (slika 6) se nahajajo v dolini Plesná v okolici Cheba na severozahodu Češke, 19 km vzhodno od kraja Frantiskovy Lazne (slika 3). Kot je v diplomski nalogi opisal Kosi (2012), smo vzorčili korenine rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.) na travniku, na katerem je vegetacija pokošena redno, enkrat ali dvakrat letno (Renner in sod., 2011). Vegetacija je zaradi variirajoče sestave talne atmosfere precej heterogena in sestoji iz trajnih, negozdnih zelišč in trav združb *Valeriano – Filipenduletum*, *Arrhenateratalia* ali *Molinietalia*, odvisno od količine podtalnice in prevladujočih plinskih razmer v tleh (Renner in sod., 2011). Združba rastlin se v neposredni okolici izvirov CO₂

razlikuje od združbe na kontrolnih območjih (Saßmannshausen, 2010). Za območje izvirov geološkega CO₂ je značilen pojav mofetofilnih rastlinskih vrst, ki jih lahko uporabimo kot rastlinski indikator povečanih talnih koncentracij CO₂ (Pfanzen in sod., 2004).

Na območju, kjer smo vzorčili korenine za raziskave diverzitete AM gliv v koreninah, je povsod prisotna rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). To je relativno pogosta rastlinska vrsta, ki je prisotna na celotnem razponu koncentracij talnega CO₂. Najugodnejša za rast te rastline so vlažna, mokra ali močvirnata humozna ali glinasta tla, bogata ali revna s hranili, zmerno kislila. Dobro prenaša zmerno zasenčenost in jo zato najdemo, poleg travnišč, tudi v vlažnih gozdovih. Uspeva vse od nižin do alpskega pasu (Martinčič in sod., 2007). Posledica izhajanja geološkega plina je lahko talna hipoksija ali celo anoksija, ki je značilna tudi za z vodo nasičena tla. Verjetno je prav zato ta vrsta na območju naravnih izvirov CO₂ na Češkem prisotna na vseh lokacijah, izpostavljenih različnim koncentracijam CO₂, vključno z najbolj ekstremnimi, z izmerjeno talno koncentracijo CO₂ 99,9 %.

Prevladujoči tip tal, glinena ilovica, se je razvil iz rečnih holocenskih sedimentov. pH v tleh je povprečno 4,1, lahko se spusti do pH 3 ali pH 2, na območjih, kjer se koncentracije CO₂ v tleh dvignejo do 100 %. Koncentracija skupnega ogljika v tleh je med 38 in 88 g / kg (Russell in sod., 2011). Podrobnejši podatki o meritvah koncentracije CO₂ in O₂ ter podatki o ostalih talnih lastnostih so predstavljeni v preglednici 11.



Slika 6. Češke mofete v dolini Plesná v okolici Cheba (fotografirala I. Maček).

Figure 6. Czech mofettes in Plesna valley near Cheb (photo by I. Maček).

3.2.4 Naravni izviri CO₂ Bossoleto v Italiji (italijanske mofete)

Italijanski naravni izviri CO₂ Bossoleto (slika 7) so blizu kraja Rapolano v Toskani (slika 3). To območje je poznano po geotermalnih vrelih in je v bližini term. Gre za udorno dolino, ki ima v premeru približno 80 metrov in globino 20 metrov, kjer na dnu in na pobočjih izhaja zelo čist (99 %) CO₂ geološkega izvora v velikih količinah, tako da lahko vrednosti v zraku dosežejo tudi od 80 do 90 %. Rastje v dolini sestavlja predvsem plazeča šopulja (*Agrostis stolonifera* L.), ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.), črnika (*Quercus ilex* L.) in puhasti hrast (*Quercus pubescens* Willd.). Na dnu doline pa prevladuje navadni trst (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.), vendar je rast rastlin tam, kjer je izhajanje CO₂ največje, močno omejena (povzeto po Plestenjak, 2006).

Zaradi oblike doline in nižjih temperatur zraka je tekom noči koncentracija CO₂ na dnu doline visoka. Kadar so koncentracije tako visoke, je možno opaziti mejo med zrakom s povečano koncentracijo CO₂ in zrakom z manj CO₂. Do tega pojava pride zaradi različnih gostot zračnih mas in se kaže kot meglica na dnu doline. To se dogaja vsak dan med 7. in 9. uro zjutraj, potem pa se zaradi povečane temperature zraka in vetra koncentracija CO₂ zmanjša (povzeto po Plestenjak, 2006).

Za območje italijanske mofete Bossoleto je značilno, da poleg CO₂ geološkega izvora iz tal izhajajo tudi povečane koncentracije vodikovega sulfida (H₂S), čeprav so bile te le malo nad mejo detekcije (Hättenschwiler in sod., 1997).

Podrobnejši podatki o talnih lastnostih so predstavljeni v preglednici 12.



Slika 7. Območje italijanskih mofet Bossoleto v bližini kraja Rapolano (fotografirala I. Maček).

Figure 7. Italian mofettes Bossoleto near Rapolano (photo by I. Maček).

3.3 ARBUSKULARNE MIKORIZNE GLIVE

3.3.1 Vzorčenje korenin

3.3.1.1 Travniške mofete v okolici Stavešincev

Z območja stavešinskih mofet smo vzorčili izvrtke tal (globine 10 cm in širine 15 cm) na treh lokacijah, imenovanih Mofeta 1, Mofeta 2 in Mofeta 3 (slika 8). Iz vsake od teh lokacij smo izbrali po 2 območji, ki imata različno koncentracijo CO₂, z več kot > 37 % CO₂ (**visok CO₂**), izmerjenega v talnem zraku in manj kot 2,9 % CO₂ (**kontrola**). Vzorčili smo na podlagi izmerjene koncentracije CO₂ in O₂ v talnem zraku (glej poglavje 3.1 za opis meritev koncentracij talnih plinov) v sredini vsakega talnega izvrtka (preglednica 7) med aprilom in oktobrom leta 2010 in med aprilom in oktobrom leta 2011 (od 29. 4. do 4. 5. 2010, od 29. 6. do 30. 6. 2010, od 16. do 18. 8. 2010, od 26. 10. do 29. 10. 2010, od 14. do 20. 4. 2011, od 27. 6. do 29. 6. 2011, od 24. do 26. 8. 2011 in od 24. do 26. 10. 2011). Z območja z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnega območja smo vzeli po štiri ponovitve izvrtkov, na katerih smo najprej naredili popis rastlin (preglednica 9). Iz izvrtkov smo nato izolirali korenine rastlin tako, da smo talne izvrtke spirali pod tekočo vodo. Polovico očiščenih korenin smo shranili v 70 % etanolu, drugo polovico smo posušili na 40 °C (vzorčenje leta 2010) ali pa hitro zamrznili v tekočem dušiku in shranili na -20 °C (vzorčenje leta 2011). Razdalja med lokacijama Mofeta 1 in Mofeta 2 je približno 14 m, med lokacijama Mofeta 2 in Mofeta 3 približno 37 m in med lokacijama Mofeta 1 in Mofeta 3 približno 46 m (slika 8). Znotraj lokacij je med območji z različnim režimom CO₂ (visoka koncentracija CO₂ in kontrola) razdalja približno 4 m pri Mofeti 1, 14 m pri Mofeti 2 in 6 m pri Mofeti 3 (slika 8).



Slika 8. Območje travniških mofet v okolici Stavešincev. Na sliki so prikazane posamezne lokacije vzorčenja, Mofeta 1, Mofeta 2 in Mofeta 3 (vir posnetka: Google Maps).

Figure 8. Meadow mofettes near Stavešinci. Micro locations of Mofette 1, Mofette 2 and Mofette 3 are shown (photo source: Google Maps).

3.3.1.2 Gozdne mofete na Stavešinskem vrhu

Vzorčenje na območju gozdnih mofet je bilo izvedeno na enak način kot na travniških mofetah. Vzorčili smo torej na eni gozdni lokaciji z dvema različnima plinskima režimoma. **Visok CO₂**, kjer so bile vrednosti CO₂ v talnem zraku > 58 %, ter **kontrola** s koncentracijo CO₂ < 1,6 % (preglednica 10). Razdalja med gozdnimi mofetami in travniškimi mofetami v okolici Stavešincev je približno 1,3 km (slika 2). Razdalja znotraj lokacije gozdnih mofet, med območjem z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnim območjem, je 14 m.

3.3.1.3 Češke mofete

Na travniku čeških mofet so bile 15. 5. 2008 vzorčene korenine rušate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). Vzorčenje in meritve koncentracij talnih plinov je izvedla dr. Irena Maček. Rastlina je bila prisotna na celotnem razponu koncentracij talnega CO₂. Vzorčili smo na območju z visoko koncentracijo CO₂ (78,7 ± 20,7 % CO₂) ter na

kontrolnem območju ($0,8 \pm 0,6$ % CO₂) (preglednica 11). Korenine smo dobro oprali v vodi, ter polovico korenin shranili v 70 % etanolu, drugo polovico pa posušili na zraku. Ocenjevanje mikoriznega statusa korenin je v diplomski nalogi opisal Borut Kosi (2012), molekulska analiza sestave združb AM gliv je predstavljena v tej doktorski disertaciji.

3.3.1.4 Italijanske mofete

Junija 2008 smo na območju italijanske mofete vzorčili korenine štirih vrst rastlin, na območju z visoko koncentracijo CO₂ in na kontrolnem območju. Vzorčenje in meritve izhajanja CO₂ iz tal je izvedla dr. Irena Maček. Vzorčili smo plazečo šopuljo (*Agrostis stolonifera* L.), ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.), navadni trst (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) in bleščeeči glavinec (*Centaurea alba* L.). Ozkolistnega trpotca nismo našli na območju z visoko koncentracijo CO₂ ($> 170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tako da smo ga vzorčili na območju s srednjo koncentracijo CO₂ ($41 \pm 8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vzorci so bili izbrani na podlagi izmerjenih fluksov CO₂ iz tal (preglednica 12) z aparatom Li-6400 (Licor, ZDA). Na območjih visoke vrednosti CO₂ so se vrednosti toka CO₂ v povprečju gibale med 40 in 270 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Na podlagi pozitivne povezave med tokom CO₂ in koncentracijo CO₂ (Vodnik in sod., 2009) lahko podamo grobo oceno o koncentracij CO₂ na območju visoke koncentracije CO₂ mofete Bossoleto, ki se giblje med 15 in 80 % CO₂ v tleh. Korenine smo dobro oprali v vodi ter polovico korenin shranili v 70 % etanolu, drugo polovico pa posušili na zraku ter kasneje uporabili za izolacijo DNK AM gliv in analizo njihovih združb.

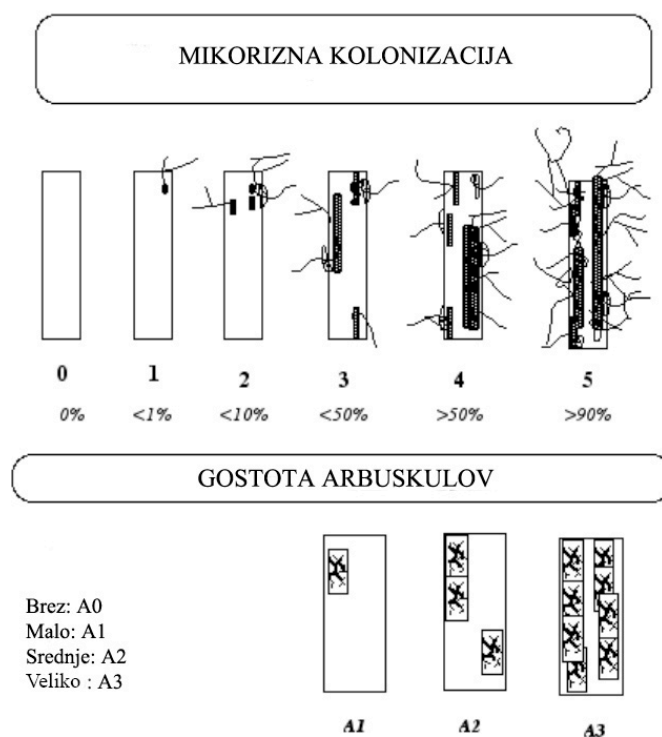
3.3.2 Ocenjevanje mikorizne kolonizacije v koreninah rastlin

Teste ocene mikorizne kolonizacije v mešanih vzorcih rastlinskih korenin smo izvedli na vzorcih s travniških mofet v okolici Stavešincev, na vseh treh travniških lokacijah. Korenine rastlin smo vzorčili v mesecu aprilu, juniju, avgustu in oktobru leta 2010 na območjih z visoko koncentracijo CO₂ ter na kontrolnih območjih. Polovico korenin smo po spiranju z vodo shranili v 70 % etanol za kasnejše analize kolonizacije korenin z AM glivami. Kolonizacijo z AM glivami smo ocenili v 5 koreninah dolžine 1 cm iz vsake ponovitve, skupaj 20 korenin na posamezni plinski režim (visok CO₂, kontrola), za vsako lokacijo (Mofeta 1, Mofeta 2, Mofeta 3) in za vzorčenje v vsakem mesecu (april, junij, avgust, oktober).

Pred ocenjevanjem kolonizacije smo korenine 10 do 30 minut, odvisno od njihove debeline, presvetljevali z 10 % KOH pri temperaturi 90 °C. Po presvetljevanju smo korenine sprali z vodo in jih zakisali z 1 N HCl za 5 minut pri sobni temperaturi. Po zakisanju smo korenine 10 minut barvali v 0,05 % raztopini tripan modro (v laktoglicerolu) prav tako pri temperaturi 90 °C. Ko smo korenine po barvanju dobro izprali z vodo, smo

jih shranili v laktoglicerolu (glicerol : mlečna kislina : voda v masnem razmerju 80 : 40 : 40) pri 4 °C do ocenjevanja kolonizacije.

Kolonizacijo korenin z AM glivami smo ocenjevali pod mikroskopom po metodi opisani v publikaciji Trouvelot in sod. (1986). Iz posameznih vzorcev korenin smo vzeli po 5 koreninic dolžine 1 cm, ki smo jih razporedili na objektna stekelca, dodali kapljico laktoglicerola ter jih pokrili s krovnim stekelcem. Pri posameznem vzorcu smo ocenjevali dva parametra mikorizne kolonizacije: mikorizno kolonizacijo v razredih 0 do 5 ter gostoto arbuskulov v razredih A0 do A3 (slika 9). Na podlagi tako pridobljenih ocen smo izračunali frekvenco delov korenine z glivo (F %), intenziteto mikorize (M %), intenziteto mikorize v koloniziranih delih korenin (m %), gostoto arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo (a %) in gostoto arbuskulov v koreninskem sistemu (A %).



Slika 9. Ocenjevanje mikorizne kolonizacije v koreninah. Kolonizacija korenin z arbuskularno mikorizo se na podlagi % mikorizne kolonizacije v korenini rastline razvršča v razred 0 (0 % kolonizacije), razred 1 (< 1 %), razred 2 (< 10 %), razred 3 (< 50 %), razred 4 (> 50 %) in razred 5 (> 90 %). Gostota arbuskulov se razvršča v razrede A0 (brez arbuskulov), razred A1 (malo arbuskulov), razred A2 (srednje veliko arbuskulov) in razred A3 (veliko arbuskulov) (povzeto po Trouvelot in sod., 1986).

Figure 9. Estimation of root colonisation by AM fungi. Colonisation of roots with arbuscular mycorrhiza is classified based on % of micorrhizal colonisation in plant root into class 0 (0 % colonisation), class 1 (< 1 %), class 2 (< 10 %), class 3 (< 50 %), class 4 (> 50 %) and class 5 (> 90 %). Arbuscule abundance is classified into class A0 (none arbuscules), class A1 (few arbuscules), class A2 (frequent arbuscules) and class A3 (abundant arbuscules) (according to Trouvelot et al., 1986).

Za izračun parametrov AM kolonizacije smo uporabili naslednje formule (povzeto po Maček, 2004).

Frekvenca delov korenin z glivo

$$F (\%) = (\text{število mikoriziranih korenin} / \text{število vseh korenin}) * 100 \quad \dots (1)$$

F (%) vrednost odraža razpoložljivost propagulov AM gliv v tleh.

Intenziteta mikorize

$$M (\%) = (95 n_5 + 70 n_4 + 30 n_3 + 5 n_2 + n_1) / (\text{število vseh korenin}) \quad \dots (2)$$

Kjer je n_5 , n_4 , n_3 , n_2 in n_1 število fragmentov razvrščenih v posamezni razred.

M (%) nam daje informacijo, kolikšen del koreninske skorje celotnega koreninskega sistema je koloniziran z AM glivami.

Intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenine

$$m (\%) = M * (\text{število vseh korenin}) / (\text{število mikoriziranih korenin}) = M * 100 / F \quad \dots (3)$$

m (%) nam pove, kolikšna je infektivnost glive, tudi če glivnega inokuluma v tleh (F %) ni veliko.

Gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo

$$a (\%) = (100 m A_3 + 50 m A_2 + 10 m A_1) / 100 \quad \dots (4)$$

Kjer je:

$$m A_3 = [(95 n_5 A_3 + 70 n_4 A_3 + 30 n_3 A_3 + 5 n_2 A_3 + n_1 A_3) / \text{št. mikoriziranih korenin}] * 100 / m \quad \dots (5)$$

$n_1 A_3$, $n_2 A_3$, ..., $n_5 A_3$ = število fragmentov z gostoto arbuskulov v razredu A_3 v posameznih razredih za mikorizno kolonizacijo.

a (%) je gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo. Odraža potencial mikoriznih simbiotov in kaže nivo fiziološke kompatibilnosti.

Gostota arbuskulov v koreninski skorji

$$A (\%) = a * (M / 100) \quad \dots (6)$$

A (%) je gostota arbuskulov v koreninskem sistemu, kvalitativna ocena mikorizne »*in situ*«.

Zgoraj opisane parametre smo izračunali s pomočjo računalniškega programa MycoCalc (Trouvelot in sod., 1986; dostopen na <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/MycoCalc-prg/download.html>).

3.3.2.1 Statistična obdelava podatkov

Razlike med povprečji za posamezni parameter kolonizacije korenin z AM glivami smo izračunali z uporabo neparametričnega Kruskal-Wallisovega testa. Za izračune smo uporabili programski jezik R verzije 3.0.1 s paketom Rcmdr (R Development Core Team, 2011).

3.3.3 Molekulska analiza združb AM gliv v koreninah vzorčenih rastlin

Za oceno sestave združb AM gliv v vzorcih korenin smo uporabili metodo pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche) (glej tudi opis postopka v poglavju 3.3.3.3). Uporabili smo molekulski označevalec jedrne DNK ribosomske RNK (rRNK) – male podenote ribosoma (18S SSU; slika 1). Regija je primerna za analizo sestave združb AM gliv z metodo pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche) (Öpik in sod., 2009; Dumbrell in sod., 2011). Dolžina pomnoženega produkta PCR (opis v poglavju 3.3.3.2; slika 1) je 550 baznih parov. Ta dolžina ustreza sistemu GS-FLX Titanium XLR70 (Roche), ki omogoča branje sekvenc do dolžine 600 baznih parov (www.454.com).

3.3.3.1 Ekstrakcija DNK

Iz 50 mg očiščenih, suhih in z mletjem v mešalnem mlinu (Retsch, Nemčija) homogeniziranih korenin smo izolirali DNK z uporabo izolacijskih kitov MoBio PowerPlant (korenine vzorčene v letu 2010) ali PowerSoil DNK (korenine vzorčene v letu 2011) (MoBio Laboratories, Inc., Carlsban, CA, ZDA), po navodilih proizvajalca.

3.3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za knjižnico DNK 18S SSU AM gliv smo uporabili delno gnezden protokol z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in pirosekvenciranje (454 GS-FLX, Roche). Pomnoževali smo 550 baznih parov dolg fragment DNK male podenote ribosoma (SSU rRNK) AM gliv iz izolata (ekstrakta) celokupne DNK s parom začetnih oligonukleotidov AM1 (specifični začetni oligonukleotid za AM glive; Helgason in sod., 1998) in NS31 (splošni evkariontski

začetni oligonukleotid; Simon in sod., 1992). PCR smo izvedli v 50 µl reakcijski mešanici, kamor smo dodali 1 µl izolirane DNK, 5U polimeraze Hot start Taq (Promega Co., Madison, WI, ZDA ali Qiagen Ltd. Crawley, VB), 2 mM dNTPs, 10 pmol vsakega izmed začetnih oligonukleotidov. Pogoji pomnoževanja v aparatu za PCR Gradient96 Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA, ZDA) so bili: začetna denaturacija 95 °C za 2 min. (Promega Taq) ali 5 min. (Qiagen Taq); denaturacija je potekala 35 ciklov pri 94 °C, 30 sek., prileganje pri 64 °C, 40 sek. in podaljševanje pri 70 °C, 1 min.; končno podaljševanje pri 70 °C, 5 min. Produkta PCR smo očistili (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen Ltd. Crawley, VB). Na podlagi koncentracije DNK, določene s spektrofotometrom (NanoDrop ND 100; Thermo Scientific, ZDA) smo združili produkte PCR tehničnih ponovitev.

Temu je sledil drugi PCR, kjer smo dodali za sekventor (454 GS-FLX, Roche) specifične fuzijske začetne oligonukleotide, ki so bili sestavljeni iz adaptorja A in B, ločevalca MID (multiplex identifiers) in začetnega oligonukleotida »WANDA« (slika 10; Dumbrell in sod., 2011). Drugi PCR smo izvedli v 50 µl reakcijski mešanici ob prisotnosti encima polimeraza Hot start Taq DNA (Promega Co., Madison, WI, ZDA ali Qiagen Ltd. Crawley, VB), 1 µl produkta PCR (predhodno združenih vzorcev), 2 mM dNTP-jev, 10 pmol vsakega začetnega oligonukleotida (slika 10). Pomnoževanje PCR je potekalo pri naslednjih pogojih: 2 min. začetne denaturacije pri 95 °C; 10 30 sek. ciklov pri 94 °C, 30 sek. prileganja pri 60 °C in 1 min. podaljševanja pri 72 °C s končnim 10 min. podaljševanjem pri 72 °C v aparatu za PCR Techne TC-512 (Techne Co, Stone, Staffs, VB). Produkta PCR smo izrezali iz gela in očistili (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen). Očiščenim produktom PCR smo določili koncentracijo s kvantitativnim PCR (Q-PCR), nato smo 24 vzorcev z enako koncentracijo produktov PCR, označenimi z različnimi ločevalci MID, nanесли v eno izmed osmih vrstic GS-FLX LR70 (titanium) plošče (454 Life Sciences / Roche Applied Biosystems, ZDA). Sekvenciranje je bilo opravljeno na Univerzi v Yorku, Oddelku za biologijo (VB).

Forward

5'-**GCCTCCCTCGCGCCATCAG** (10-bp MID) CAG-
 CCGCGGTAATTCCAGCT-3'

Reverse

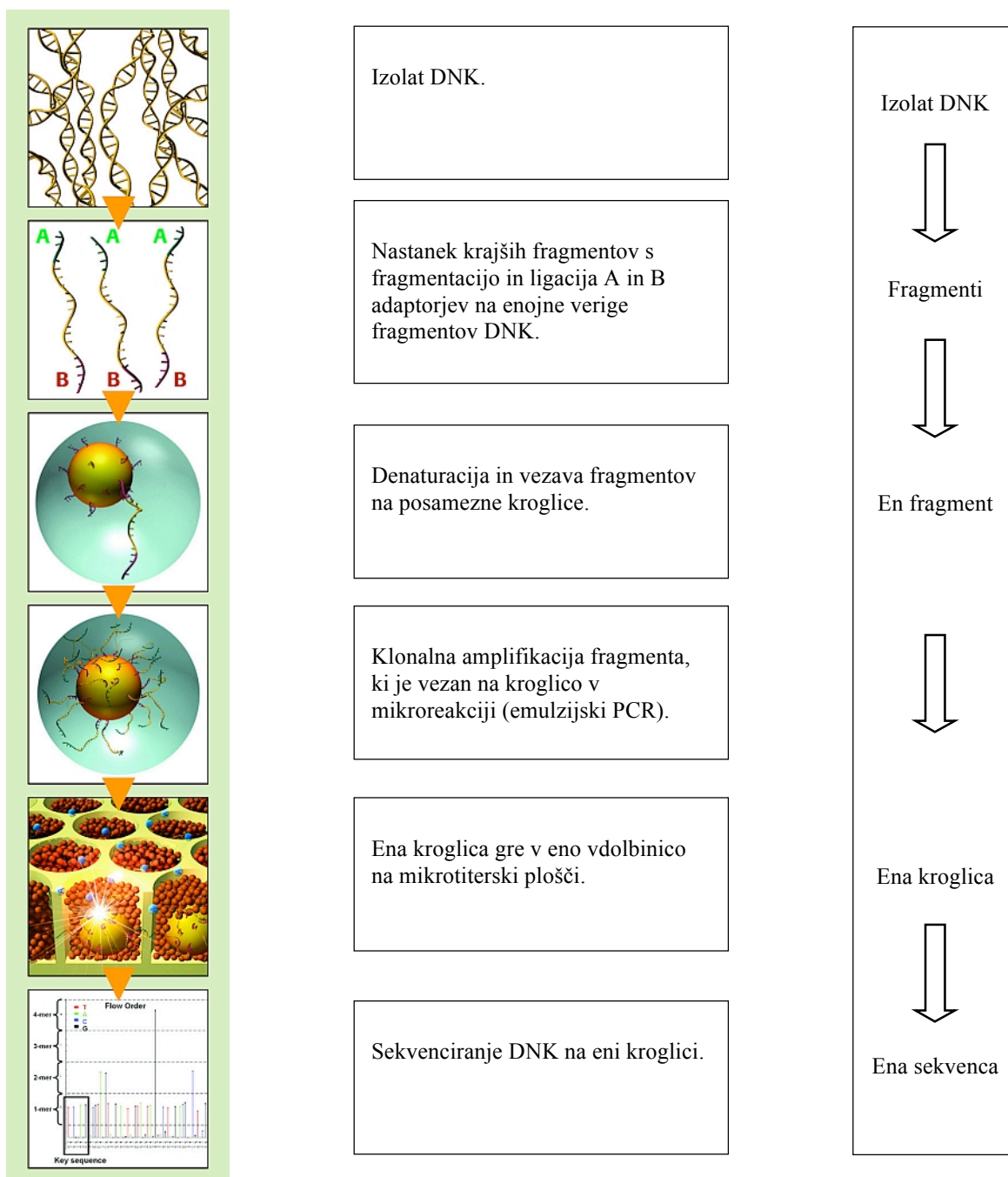
5'-**GCCTTGCCAGCCCGCTCAG** GTTTCCCGTAAG-
 GCGCCGAA-3'

Slika 10. Uporabljeni fuzijski začetni oligonukleotidi. »Forward« začetni oligonukleotid je sestavljen iz adaptorja A (prikazan z odebeljenim besedilom), ki je specifičen za reakcijo pirosekvenciranja, sledi mu 10 baznih parov dolg ločevalec MID (multiplex identifier) in »forward« začetni oligonukleotid WANDA. »Reverse« začetni oligonukleotid je sestavljen iz adaptorja B (označen z odebeljenim besedilom), ki mu sledi »reverse« začetni oligonukleotid AM1 (Dumbrell in sod., 2011).

Figure 10. The fusion primers used for the secondary PCR. The forward primer comprises the A adaptor (in bold type) for the pyrosequencing reaction, the 10bp MID (multiplex identifier) and forward primer WANDA. The reverse primer comprises the B adaptor (in bold type) and the reverse primer AM1 (Dumbrell et al., 2011).

3.3.3.3 Pirosekvenciranje s pomnoževanjem na kroglicah (454 GS-FLX, Roche)

Gre za prvo tehnologijo sekvenciranja nove generacije, ki zamenja korak kloniranja DNK z visoko učinkovitim *in vitro* pomnoževanjem, poznanim kot emulzijski PCR (Griffiths in Tawfik, 2006). Iz izolata DNK s fragmentacijo in ligacijo z adaptorjema A in B naredimo krajše in enojne fragmente DNK (slika 11). Nato izvedemo denaturacijo in vezavo fragmentov na posamezne kroglice, ki vsebujejo oligonukleotide, ki so komplementarni adaptorjem. Kroglice vključimo v posamezne oljne kapljice, ki predstavljajo individualna mesta za pomnoževanje s PCR. Vsaka posamezna kroglica se nato prestavi v svojo vdolbinico na pikotiterski plošči, dodajo se encimi in substrati potrebni za pirosekvenciranje (encimi polimeraza DNK, sulfurilaza ATP, luciferaza in apriaza ter adenozin 5`fosfosulfat in luciferin). Uporaba pikotiterskih plošč omogoča vzporedno izvedbo več sto tisoč pirosekvencijskih reakcij (povzeto po <http://www.454.com>).



Slika 11. Pregled postopka pirosekvenciranja 454 (povzeto po <http://www.454.com>)

Figure 11. Overview of 454 sequencing workflow (according to <http://www.454.com>).

3.3.4 Bioinformatika in statistična obdelava podatkov

Zaradi velikega števila sekvenc smo sekvence najprej zbrali v gruče na podlagi 97 % podobnosti med sekvencami. Iz teh gruč sekvenc smo nato izbrali reprezentativne sekvence, katere smo identificirali na podlagi podatkovne baze MaarjAM.

Najprej smo sekvence dodelili posameznim vzorcem na podlagi ločevalcev MID (multiplex identifiers), nato smo odstranili sekvence slabe kvalitete, popravili napake (šume) na sekvencah in odstranili himerne sekvence, ki so artefakti verižne reakcije s polimerazo (PCR). Prav tako smo odstranili sekvence, ki so bile krajše od 400 in daljše od 650 baznih parov. Za obdelavo sekvenc smo uporabili protokol QIIME (Caporaso in sod., 2010).

Sekvence, ki so si bile med seboj podobne več kot 97 %, smo zbrali v gručo, imenovano molekulska operativna taksonomska enota **MOTU** (ang. »Molecular Operational Taxonomic Units«). Gruče MOTU smo določili na podlagi 97 % podobnosti med sekvencami z metodo Usearch (Edgar, 2010). Iz vsake gruče sekvenc smo izbrali najbolj abundantno sekvenco, ki predstavlja **reprezentativno sekvenco** vsakega MOTU. Reprezentativne sekvence vsakega MOTU smo primerjali z bazo podatkov NCBI (National Center for Biotechnology Information) in s podatkovno bazo MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>; Öpik in sod., 2010), in sicer z uporabo iskalnega algoritma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul in sod., 1990). Na podlagi rezultatov iskalnega algoritma BLAST smo izločili sekvence, ki niso pripadale AM glivam. Na podlagi primerjav reprezentativnih sekvenc MOTU s sekvencami v podatkovni bazi MaarjAM smo lahko določili njim najbližje **virtualne taksone** (VTX; Öpik in sod., 2010), ki so implementirani znotraj podatkovne baze MaarjAM. Virtualni taksoni predstavljajo poenoten sistem za poimenovanje filotipov oz. MOTU AM gliv, kar lahko uporabimo kot približek za rod (Öpik in sod., 2013), ko želimo med seboj primerjati reprezentativne sekvence iz različnih ekoloških raziskav.

Za izdelavo filogenetskega drevesa smo reprezentativne sekvence vsakega MOTU in sekvence njim najbližjih filogenetskih sorodnikov (glede na bazi MaarjAM in NCBI) poravnali z uporabo metode ClustalW (Thompson in sod., 1994). Filogenetsko drevo smo sestavili z uporabo stohastičnega modela za zamenjavo nukleotidov Jukes-Cantor (Jukes in Cantor, 1969), distančne metode združevanja najbližjega soseda »neighbor-joining« in z metodo vezanja »bootstrap« smo na podlagi 1000 permutacij sestavili filogenetsko drevo. Filogenetsko drevo smo koreninili z *Corallochytrium limacisporum*, bičkarjem ovratničarjem, kot zunanjikom (»outgroup«) vseh gliv (Vandenkoornhuyse in sod., 2002). Vse filogenetske analize smo izvedli s programom Geneious verzija 5.5.7 (Drummond in sod., 2011).

Da bi lahko preverili, ali sta filotipa Glo85 in Glo86 (Maček in sod., 2011) podobna kateremu izmed taksonov MOTU, smo reprezentativno sekvenco Glo85 (FN869895) in reprezentativno sekvenco Glo86 (FN869896) primerjali z reprezentativnimi sekvencami vseh 32 MOTU iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Primerjavo sekvenc smo izvedli z uporabo iskalnega algoritma BLAST (Altschul in sod., 1990) tako, da smo izbrali primerjavo ene sekvence Glo z vsemi sekvencami MOTU.

Za določitev razlik v številu analiziranih sekvenc pri posameznem vzorcu smo število sekvenc med vzorci z območji z različnim CO₂ režimom analizirali z uporabo neparametričnega Kruskal-Wallisovega testa.

Da bi preverili, kako dobro smo vzorčili območje naravnega izvira CO₂ v Stavešincih (intenziteta vzorčenja), smo pri raziskavah sestave združb in diverzitet arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv ter tudi arhej in bakterij izračunali **krivulje kopičenja vrst** (oz. v našem primeru **krivulje kopičenja MOTU**) (slika 16). To je graf naraščanja skupnega števila odkritih vrst v določenem območju, kot funkcija skupne mere truda, vloženega v njihovo iskanje oz. učinkovitosti vzorčenja (Colwell in sod., 2004). Trud je lahko predstavljen s številom vzorcev, površino kvadratov, z urami opazovanja itd. Ko se odkrivanje vrst kljub dodatnemu trudu ustavi, s čimer krivulja kopičenja vrst ne narašča več, oziroma se približa asimptoti, na območju ne pričakujemo več odkrivanja novih vrst (Colwell in sod., 2004). Zaporedna akumulacija posameznih vrst enega vzorca ali zaporedno združevanje vzorcev iz enega seta vzorcev omogoča izračun krivulje kopičenja vrst, ki pa zaradi prostorske in časovne razpršenosti in stohastične narave zaplat ne bo gladka (Colwell in sod., 2004). Krivulja kopičenja vrst torej prikazuje skupno število vseh vrst, ki smo jih zabeležili tekom vzorčenja, tako da dodajamo posameznike ali posamezne enote vzorcev v skupino vseh prej zabeleženih posameznikov ali vzorčnih enot. Krivulje kopičenja vrst lahko temeljijo na posameznikih ali na vzorcih (Gotelli in Colwell, 2001) in se pogosto predstavljajo s povprečjem in standardno napako.

Drugi tip krivulj, s katerimi lahko preverimo zadostno upoštevanje vpliva abundance vrst in učinkovitosti vzorčenja na rezultate pri kvantifikaciji in primerjavi vrstne pestrosti, so **krivulje redčenja vrst** (oz. v našem primeru **krivulje redčenja MOTU**) (Gotelli in Colwell, 2001). Primer krivulje redčenja vrst je slika 15. Tehnika redčenja v ekologiji ocenjuje pestrost vrst kot rezultat vzorčenja. Omogoča nam, da izračunamo pestrost vrst izbranega števila posameznih vzorcev. Ta izračun temelji na izdelavi krivulj redčenja vrst. Te krivulje predstavljajo graf števila vrst kot funkcijo števila vzorcev. Če se krivulja strmo dviguje, je velik del diverzitet vrst ostal neodkrit, medtem, ko smo večino diverzitet vrst že odkrili, če se krivulja približuje asimptoti. To pomeni, da bolj intenzivno vzorčenje ne bi pripomoglo k večji diverziteti vrst. Krivulje redčenja vrst nastanejo s ponavljajočim naključnim jemanjem vzorcev iz bazena posameznikov ali vzorcev in tako beležijo povprečno število vrst, ki jih predstavlja 1, 2 ... N posameznikov ali vzorcev. Vzorčenje je narejeno brez vračanja znotraj vsakega ponovnega jemanja vzorcev. Redčitev tako generira

pričakovano število vrst znotraj majhnega nabora n posameznikov ali vzorcev nastalega naključno iz velikega bazena N posameznikov ali vzorcev (Gotelli in Colwell, 2001).

Razlike v sestavi združb AM gliv med območji z različnim režimom CO₂ smo vizualizirali z uporabo **kanonične korespondenčne analize (CCA)**. CCA predpostavlja, da prisotnost in številčnost vrst (oz. MOTU) vzdolž okoljskega gradienta sledi Shelfordovemu zakonu tolerance, kjer (i) vsaka vrsta najbolje uspeva pri določeni vrednosti spremenljivke, optimumu vrste, in ne more preživeti, če so vrednosti spremenljivke previsoke ali prenizke in (ii) odvisnost med okoljsko spremenljivko in številčnostjo vrste je običajno simetrično unimodalna (Ter Braak, 1987). V CCA opišemo večrazsežnost z več okoljskimi spremenljivkami, z njihovo kombinacijo pa z metodo CCA dobimo najboljši sestavljeni okoljski gradient kot linearno kombinacijo okoljskih spremenljivk, ki ločijo niše vrst vzdolž gradienta (kanonične osi) (povzeto po Urbanič, 2004). Okoljski vektorji, prikazani na ordinacijah CCA, so izračunani na podlagi 10.000 permutacij. Za izračune smo uporabili programski jezik R verzije 3.0.1 s paketoma »vegan« in »stats« (R Development Core Team, 2011).

Razlike v sestavi združb AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnih območij smo analizirali z **diverzitetnimi indeksi, določenimi s Hillovimi števili** (Hill, 1973). Po Hillovi (Hill, 1973) zaslugi je njihovo računanje poenostavljeno, zlasti pa praktično razumljivo, saj je poenotil računanje diverzitete pri najbolj pogosto uporabljenih indeksih. Hillovo število 0 predstavlja pestrost vrst, Hillovo število 2 proporcionalno abundanco vsake vrste (inverzni Simpsonov indeks) in Hillovo število ∞ proporcionalno abundanco najbolj pogosto zastopane vrste (inverzni Berger-Parkerjev indeks). Diverzitetne indekse smo uporabili, da bi lahko določili, ali je diverziteta AM gliv povezana z naraščanjem koncentracije CO₂ v tleh. Kot osnovo za izračun Hillovih števil, uporabljenih v doktorski disertaciji, smo uporabili naslednje indekse (Hill, 1973):

- **Hillovo število 0 (N0)**

Število taksonov/vrst predstavlja **pestrost vrst**, torej skupno število vrst identificiranih v vzorcu. $1/N0$ predstavlja harmonično sredino relativne abundance.

- **Hillovo število 2 (N2)**

Predstavlja proporcionalno abundanco vsake vrste. $1/N0$ predstavlja aritmetično sredino relativne abundance in se lahko interpretira kot **izenačenost vrst**.

Simpsonov indeks ocenjuje verjetnost, da dva posameznika, izbrana naključno iz enega vzorca, pripadata isti vrsti.

$$D = 1 - \text{Simpson indeks} \quad \dots (7)$$

$$\text{Hill } N_2 = 1/D \quad \dots (8)$$

- **Hillovo število** N_∞ (N_∞)

Berger-Parkerjev indeks predstavlja proporcionalno abundanco najbolj pogoste vrste in ga lahko interpretiramo kot **dominanco vrst**.

$$\text{Hill } N_\infty = 1/\text{Berger-Parkerjev indeks} \quad \dots (9)$$

Z analizo sekvenc in uporabo več analitičnih pristopov (ordinacije in analize treh Hillovih števil) smo z uporabo razpoložljivih metod uspeli kar se da najbolje določiti in opisati združbo AM gliv (Bent in Forney, 2008). Kljub temu je cilj naše raziskave diverzitete AM gliv primerjati združbe na lokacijah z različnim CO₂ režimom in ne samo vrednotiti skupno diverziteto AM gliv v posameznih vzorcih. Analize diverzitete in združbe so bile narejene na podlagi števila sekvenc znotraj posameznega MOTU, z uporabo programskega jezika R verzije 3.0.1 in standardnimi R paketi »vegan« (R Development Core Team, 2011).

Za preučevanje razlike v diverzitetnih indeksih med območji z različnim režimom CO₂, različnimi meseci vzorčenja in različnimi leti vzorčenja smo uporabili večsmerno ANOVO. Kjer je bila razlika statistično značilna, smo uporabili Tukeyeve kontraste, da smo določili povprečno razliko znotraj vzorcev iz posameznega območja in Kruskal-Wallisov test rangov za določitev povprečne razlike med vzorci iz posameznega režima CO₂ (opis metod v poglavju 3.3.2.1). Statistična analiza podatkov je bila narejena s paketoma »Rcmdr« in »stats« programskega jezika R, verzije 3.0.1 (R Development Core Team, 2011).

Da bi lahko potrdili statistično značilne razlike v sestavi mikrobnih združb med območji z različnimi koncentracijami CO₂, smo uporabili permutacijsko multivariatno analizo variance (PERMANOVA, imenovana tudi neparametrična MANOVA). Posamezna območja (visok CO₂, kontrola) smo glede na prisotnost in pogostost vrst primerjali s pomočjo Bray-Curtisovega indeksa podobnosti. Vsakemu paru območij smo določili indeks podobnosti, ki predstavlja vrednost med 0 in 100 %. Če območji nimata skupne niti ene vrste, je indeks podobnosti enak 0 %, če pa so na območjih prisotne enake vrste z enako abundanco, je indeks podobnosti enak 100 %. Analizo PERMANOVE smo naredili z uporabo funkcije

»adonis«, ki je znotraj paketa »vegan« programskega jezika R, verzije 3.0.1 (R Development Core Team, 2011).

Naslednje zgoraj opisane metode (Kruskal-Wallisov test, krivulje redčenja vrst, Hillova števila, ANOVA, PERMANOVA) so bile uporabljene tudi pri analizi sestave združb in biodiverzitet arhej in bakterij, kar je podrobneje opisano tudi v poglavju 3.5.10.

3.4 ARHEJE IN BAKTERIJE

3.4.1 Vzorčenje tal

Za analizo biodiverzitet združb arhej in bakterij smo izvrtke tal vzorčili konec novembra 2009 na območju travniških mofet v okolici Stavešincev na treh lokacijah z različnimi plinskimi režimi CO₂, in sicer z vsaj 48 % CO₂ ($85,5 \pm 21,7$ % CO₂, **visok CO₂**), od 11 do 20 % CO₂ ($13,8 \pm 3,2$ % CO₂, **srednji CO₂**) in z manj kot 0,2 % CO₂ v talnem zraku ($0,2 \pm 0,0$ % CO₂, **kontrola**). Vzorci so bili izbrani na podlagi meritev koncentracije CO₂ in O₂ v sredini vsakega izvrtka tik pred vzorčenjem (preglednica 13). Na vsaki od izbranih lokacij smo vzorčili trikrat ($n = 3$ za visoko, srednjo in kontrolno koncentracijo CO₂) in vsakič smo odvzeli tri 5 cm široke in 15 cm globoke vzorce tal neposredno pod rastlinskimi koreninami. Vzorce smo nato združili in presejali skozi 8 mm sito. Vzorce tal smo pred ekstrakcijo DNK hranili pri temperaturi -80 °C. Območja z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolna območja ter območja z visoko ter s srednjo koncentracijo CO₂ so si bila med seboj oddaljena cca. 46 cm, medtem ko sta si bili kontrolna lokacija in lokacija s srednjo izpostavitvijo geološkemu CO₂ oddaljeni 7 m.

3.4.2 Molekulska analiza arhejskih in bakterijskih združb

3.4.2.1 Izolacija DNK

DNK smo izolirali iz 0,5 g tal (po dve ekstrakciji za vsak vzorec) z uporabo izolacijskega kita PowerSoil DNA (MoBio Solano Beach, CA, ZDA) v skladu z navodili proizvajalca. Izoliran DNK smo do nadaljnje analize hranili pri temperaturi -20 °C.

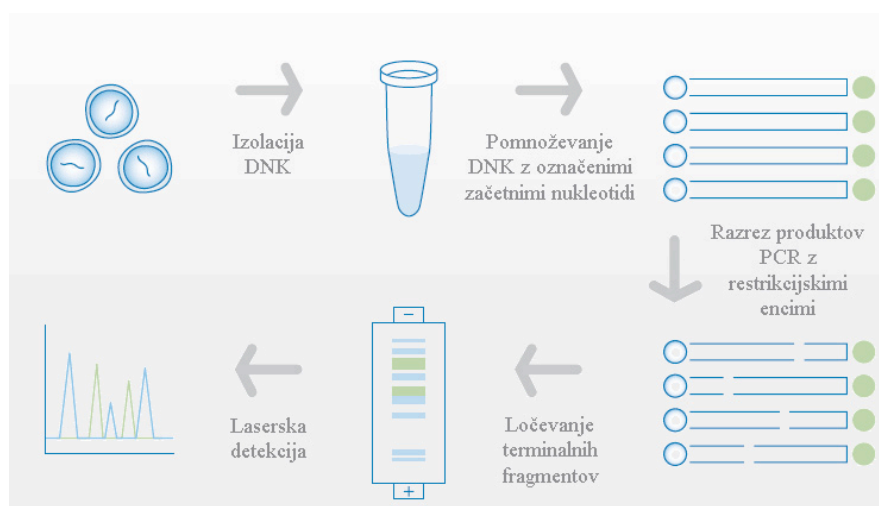
3.4.2.2 Dolžinski polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)

Preučevanje polimorfizma dolžine terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) tarčnih genov 16S rRNK je na področju mikrobne ekologije zaradi svoje filogenetske ločljivosti in enostavne analize velikega števila vzorcev vedno pogosteje uporabljena analiza. Z uporabo

analize T-RFLP lahko torej preučimo vpliv različnih okoljskih dejavnikov na strukturo in dinamiko mikrobnih združb.

Tipično je analiza T-RFLP sestavljena iz petih korakov (slika 12):

1. izolacija in čiščenje DNK iz okoljskega vzorca,
2. pomnoževanje fragmentov DNK z fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi (na 5' koncu označeni s fluorokromom),
3. razrez produktov PCR z restriktivnimi encimi, kjer se ustvarijo fluorescentno označeni končni fragmenti;
4. ločevanje terminalnih fragmentov po velikosti in višini, na ustrezni kapilarni ali elektroforetski platformi,
5. laserska detekcija fluorescentnih signalov terminalnih fragmentov.



Slika 12. Pregled postopkov pri analizi T-RFLP (povzeto po <http://www.appliedbiosystems.com>).

Figure 12. An overview of the T-RFLP technique (according to <http://www.appliedbiosystems.com>).

Da bi preverili, ali obstajajo značilne razlike med sestavo in diverzitetno v združbi arhej in bakterij, vzorčenih z območij z različno koncentracijo CO₂, smo uporabili analizo dolžinskega polimorfizma terminalnih restriktivskih fragmentov (T-RFLP). Izbrana začetna oligonukleotida za pomnoževanje bakterijskih genov 16S rRNK sta 27f in 927r, za pomnoževanje arhejskih genov 16S rRNK pa 109f in 915r (preglednica 3), označena na 5' koncu z 6-FAM (6-karboksifluorescein). Mešanico PCR smo pripravili v 25 µl reakcijah z 0,2 mM dNTP, 0,2 mM posameznega začetnega oligonukleotida, 0,2 – 0,4 mg ml⁻¹

govejega serumskega albumina (BSA), 2 mM MgCl₂, 1x brezbarvnega pufru GoTaq (vsebuje dodatnih 7,5 mM Mg) in 1 U polimeraze Taq DNK (Promega, Madison, WI, ZDA). Pri PCR smo uporabili sledeče temperaturne cikle: začetna denaturacija (6 min. pri 94 °C), 25 (22 v primeru bakterij) ciklov po 1 min. pri 94 °C, 1 min. prileganje pri 53 °C in 1 min. podaljševanja na 72 °C, čemur je sledil končni korak podaljševanja, 10 min. pri 72 °C. Pomnoževanje smo izvedli v termobloku Biometer UNO (Biotron, Göttingen, Nemčija). Oba produkta PCR smo združili, da bi zmanjšali variabilnost PCR. Približno 200 ng fluorescenčno označenega produkta PCR iz vsakega vzorca smo v 30 ml reakcijski mešanici razrezali z restrikcijskima encimoma HaeIII (MBI Fermentas, Litva) in HhaI (MBI Fermentas, Litva) in jih nato očistili z etanolno precipitacijo. Vzorcem smo primešali 0,5 µl velikostnega standarda GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems, ZDA) in 10 ml deioniziranega formamida. Pred analizo fragmentov smo vzorce denaturirali pri 95 °C za 2 min. in ohladili na ledu. Analizo velikosti in količine terminalnih restrikcijskih fragmentov (TF) smo izvedli z analizatorjem ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, ZDA).

Preglednica 3. Pregled uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje arhejskih in bakterijskih genov 16S rRNK.

Table 3. Overview of primers used for amplification of archaeal and bacterial 16S rRNA gene.

Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5' - 3')	Referenca
27f	*AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg in sod., 1991
927r	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Lane, 1991
109f	*ACKGCTCAGTAACACGT	Grobkopf in sod., 1998
915r	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Stahl in Amann, 1991

* označen s 6-FAM (6 - karboksifluorescein) na 5' koncu za analizo T-RFLP.

3.4.2.3 Priprava knjižnic genov 16S rRNK

Po ugotovitvi, da obstajajo razlike v sestavi in diverziteti taksonov arhej ter bakterij med lokacijami z različnim plinskimi režimi na podlagi analize T-RFLP (glej poglavje Rezultati, slika 24 in slika 25), smo izdelali klonske knjižnice za vsako vzorčeno lokacijo (visok CO₂, srednji CO₂ in kontrola), in sicer v treh ponovitvah. DNK smo izolirali dvakrat, ločeno iz vsakega vzorca, in podvzorca združili po uspešni amplifikaciji s PCR. Uporabili smo enako kombinacijo začetnih oligonukleotidov kot za izvedbo analize T-RFLP, vendar brez fluorescenčnih označevalcev (preglednica 3) in enak protokol PCR. Termocikliranje smo izvedli v termobloku Biometra UNO Thermoblock (Biotron, Göttingen, Nemčija), in sicer je 6 min. začetne denaturacije pri 94 °C sledilo 30 (za arheje) oz. 23 ciklov (za bakterije) po 1 min. denaturacije pri 94 °C, nato 1 min. prileganja pri 53

°C za arheje oz. 55 °C za bakterije, 1 min. podaljševanja pri 72 °C ter zaključna stopnja podaljševanja 10 min. pri 72 °C. Produkte obeh, med seboj ločenih in uspešnih amplifikacij s PCR, smo združili, očistili z očiščevalnim kitom PCR PureLink (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA), vstavili v vektor pGEM-T Easy Vector (Promega Co., Madison, ZDA) in klonirali v celice bakterije *Escherichia coli* (JM109 High Efficiency Competent *Escherichia coli*) (Promega Co., Madison, ZDA). Pozitivno transformirane celice smo identificirali z uporabo standardne amplifikacije SP6-T7 PCR. 60 klonov iz vsake bakterijske klonske knjižnice in 68 klonov iz vsake arhejske klonske knjižnice smo izbrali za sekvenciranje, ki ga je izvedlo podjetje Macrogen Inc. (Nizozemska).

3.4.3 Bioinformatika in statistična obdelava podatkov

Profile T-RFLP posameznih vzorcev smo analizirali s programom Bionumerics, verzija 3.0 (Applied Maths), po postopku opisanem v Kraigher in sod. (2006).

Kakovost sekvenc smo vizualno pregledali in odstranili sekvence začetnih oligonukleotidov. Sekvence smo primerjali z bazo podatkov NCBI (National Center for Biotechnology Information), in sicer z uporabo iskalnega algoritma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul in sod., 1990). Sekvence, ki niso pripadale arhejam in bakterijam, smo izločili. S protokolom QIIME (Caporaso in sod., 2010) smo definirali gruče molekulskih operativnih taksonomskih enot – MOTU, in sicer po metodi Mothur na podlagi 95 % podobnosti sekvenc. Taksonomsko opredelitev smo izvedli na podlagi taksonomske klasifikacije iz baze Ribosomal Database Project (RDP) (Wang in sod., 2007). Z uporabo iskalnega algoritma BLAST (Altschul in sod., 1990) smo primerjali MOTU iz naše raziskave z najbližjimi filogenetskimi sorodniki, prisotnimi v bazi NCBI. Sekvence smo poravnali z uporabo metode ClustalW (Thompson in sod., 1997). Filogenetsko drevo smo sestavili z uporabo stohastičnega modela za zamenjavo nukleotidov Jukes-Cantor (Jukes in Cantor, 1969), distančne metode združevanja najbližjega soseda »neighbor-joining« in z metodo vezanja »bootstrap« na podlagi 1000 permutacij. Filogenetsko drevo smo koreninili z arhejo, kot zunanjikom (»outgroup«) vseh bakterij in bakterijo kot zunanjikom vseh arhej. Vse filogenetske analize smo izvedli s programom Geneious verzija 5.5.7 (Drummond in sod., 2011).

Razlike v številu sekvenc med vzorci z območji z različnim CO₂ režimom smo analizirali z uporabo Kruskal-Wallisovega testa. Podatke smo analizirali z uporabo statističnega jezika R (verzija 3.0.1) s standardnimi R knjižnicami in statističnim paketom »Rcmdr« (R Development Core Team, 2011).

Da bi preverili, kako dobro smo vzorčili območje travniške mofete v okolici Stavešincev (intenziteta vzorčenja), smo pri raziskavah sestave združb in diverzitete arhej in bakterij,

izračunali **krivulje kopičenja vrst** (oz. v našem primeru **krivulje kopičenja MOTU**) (poglavje 3.3.4).

Razlike v splošni sestavi združb arhej in bakterij smo analizirali na podlagi filogenetske matrike UniFrac (Lozupone in Knight, 2005) ter vizualno prikazali z analizo glavnih komponent (PCA). Z metodo PCA lahko poiščemo take linearne kombinacije opazovanih spremenljivk, da kar se da močno korelirajo z opazovanimi spremenljivkami, oziroma, da pojasnijo kar se da veliko razpršenosti (variacije) opazovanih spremenljivk (Palmer, 2013). Vhodni podatki za analizo PCA so v obliki matrike UniFrac (Lozupone in Knight, 2005), ki meri filogenetsko razdaljo med pari vzorcev, kjer vsak vzorec predstavlja mikrobovo združbo. Filogenetska razdalja se izmeri kot odstotek dolžine veje, ki vodi do prednika iz enega ali drugega okolja, ki je predstavljen v filogenetskem drevesu, torej dela evolucije, ki je edinstven eni mikrobovi združbi. Na ta način matrika odraža razlike med linijami, ki se prilagodijo na eno specifično okolje. Matrika UniFrac (Lozupone in Knight, 2005) se uporablja za združevanje različnih okolij, glede na podobnosti v sestavi združbe. Spletna aplikacija UniFrac (Lozupone in sod., 2006) omogoča tudi uporabo UniFrac statističnih testov in P-testov za določevanje značilnosti razlik med mikrobnimi združbami (Lozupone in sod., 2006).

Razlike v splošni sestavi združb arhej in bakterij smo analizirali tudi na podlagi Jaccardovega indeksa in jih vizualno prikazali z analizo nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (NMDS). Nemetrično večrazsežnostno lestvičenje spada med nedirektne gradientne analize. Metodo uporabimo, kadar je prikazovanje rezultatov v dveh ali treh dimenzijah bolj pomembno od prikazovanja dejanskih razdalj med objekti (Legendre in Legendre, 1998). Metodo lahko uporabimo, kadar želimo preveriti vnaprej določeno pripadnost vzorčnih mest na podlagi podobnosti (povzeto po Urbanič, 2004). Vhodni podatki za analizo NMDS so v obliki matrike različnosti, v našem primeru v obliki Jaccardove mere različnosti, ki je izračunana iz Jaccardove mere podobnosti. Za razliko od drugih indeksov ta bolje operira s podatki z izdatnim številom ničel (Zuur in sod., 2007). Izbrali smo 10.000 permutacij, ki so bile ugnezdene glede na vzorčna mesta. Za prikaz razmerij med vzorci smo uporabili prikaz z nemetričnim večrazsežnostnim lestvičenjem, katerega permutacije smo izvedli neugnezdeno (permutiranje po celotnem setu podatkov) (Anderson, 2001). Ta metoda je bolj primerna za analizo ekoloških podatkov (z veliko ničel) od svoje predhodnice, metode analize podobnosti (ANOSIM) (povzeto po Luštrik, 2010). Podatke smo analizirali z uporabo statističnega jezika R (verzija 3.0.1) s standardnimi knjižnicami. Analizo NMDS smo naredili z uporabo funkcije »metaMDS«, znotraj paketa »vegan« programskega jezika R verzije 3.0.1 (R Development Core Team, 2011).

Razlike v sestavi arhejskih in bakterijskih združb med območji z različnim plinskim režimom smo ovrednotili s permutacijsko multivariatno analizo variance (PERMANOVA;

glej poglavje 3.3.4) na podlagi Jaccardovega indeksa različnosti. Analizo PERMANOVE smo naredili z uporabo funkcije »adonis«, ki je znotraj paketa »vegan« programskega jezika R. verzije 3.0.1 (R Development Core Team, 2011).

Prostorske vzorce raznolikosti smo analizirali z diverzitetnimi indeksi (določenimi s Hillovimi števili; Hill, 1973), kjer Hillovo število 0 predstavlja pestrost vrst, Hillovo število 2 proporcionalno abundanco vsake vrste (inverzni Simpsonov indeks) in Hillovo število ∞ proporcionalno abundanco najbolj pogosto zastopane vrste (inverzni Berger-Parkerjev indeks) (za podrobnejši opis posameznih indeksov glej Hillova števila v poglavju 3.3.4). Vse analize diverzitete smo izvedli na podlagi števila sekvenc v posameznem MOTU z uporabo statističnega jezika R (verzija 3.0.1) s standardnimi knjižnicami. Uporabili smo funkcijo »renyi«, ki je znotraj specifičnega paketa za analizo mikrobnih združb »vegan« (R Development Core Team, 2011).

3.5 KVASOVKE

3.5.1 Vzorčenje tal

Za raziskavo biodiverzitete kvasovk smo talne vzorce na travniški mofeti v Stavešincih vzorčili novembra 2009 in junija 2010.

V vzorcih, vzorčenih novembra 2009, smo diverzitetu kvasovk analizirali z območja visoke koncentracije CO₂ in v kontrolnih vzorcih. Pri tem smo uporabili del istega vzorca tal kot tudi za analizo združb arhej in bakterij v tleh (glej poglavje 3.4.1). Podatki o koncentraciji CO₂ in O₂ v tleh ter podatki o drugih izmerjenih talnih parametrih so podani v preglednici 13.

Junija 2010 (21. 6. 2010) smo vzorčili tri talne vzorce na območju ekstremnih koncentracij CO₂ (99,9 % CO₂ na globini 20 cm) in tri kontrolne vzorce (1,2 % CO₂). Vzorce tal smo pred analizo združili in homogenizirali z mešanjem. Podatki o talnih lastnostih so podani v preglednici 14.

3.5.2 Izolacija kvasovk

Za izolacijo kvasovk iz talnih vzorcev smo uporabili več različnih izolacijskih tehnik in več različnih gojišč, kot je natančneje razvidno iz preglednice 5. Da bi preverili rast kvasovk, ki so specifične za območje z visoko koncentracijo CO₂, smo po uspešni izolaciji preverili sposobnost rasti izolatov v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂.

Izolacijske tehnike

V raziskavi smo uporabili štiri različne izolacijske tehnike, da bi povečali uspešnost izolacije različnih kvasovk iz okoljskih vzorcev.

1) Bogatitev

Pri tehniki bogatitve smo v tekoče YMA (Yeast-Mannitol Agar; preglednica 3) + Ch (kloramfenikol; Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA) dodali 1–2 g (eno malo žlico) vzorca tal.

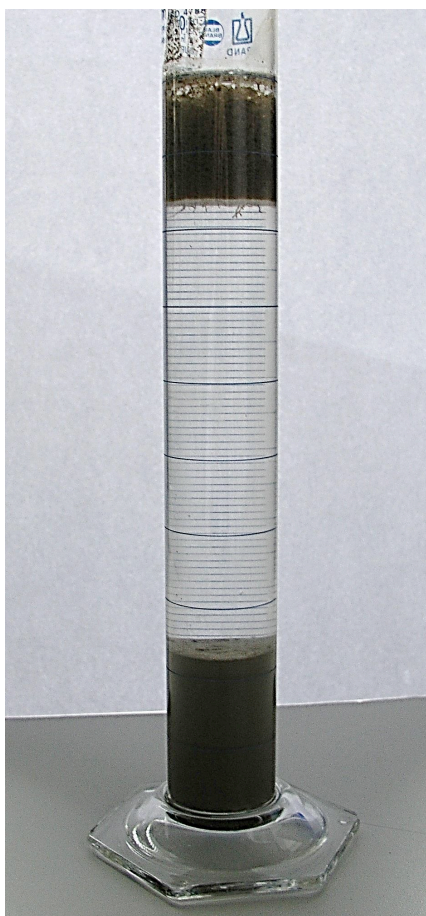
2) Redčitev s fiziološko raztopino

Vzorec tal (2 g) smo suspendirali v 10 ml fiziološki raztopini (0,9 % NaCl) in ga redčili do 10^{-3} , 10^{-4} in 10^{-5} . Redčene raztopine smo nanесли na različna gojišča (glej seznam spodaj) in inkubirali pri 25 °C.

3) Flotacijska metoda

Flotacijska metoda je povzeta po Vicente in sod. (2008), kjer so jo uporabili kot metodo za izolacijo črnih kvasovk iz okoljskih vzorcev. V naši raziskavi smo se držali navedenega protokola, z modifikacijo, da smo uporabili fiziološko raztopino brez dodatka antibiotikov.

V sterilno fiziološko raztopino (10 ml) smo dodali 20 g tal ter inkubirali pri sobni temperaturi pol ure. Po inkubaciji smo dodali 20 ml sterilnega mineralnega olja. Sledilo je 5 min. intenzivno stresanje na stresalniku. Ko se je vsebina posedla, smo vzorčili nastalo vmesno fazo med oljem, ki je vsebovalo tudi nekaj tal, in fiziološko raztopino (slika 13), ter vzorce nacepili na gojišča.



Slika 13. Flotacijska metoda: plasti mineralnega olja s tlemi (zgoraj), fiziološka raztopina (na sredini) in talna usedlina (na dnu).

Figure 13. Flotation method: layer of mineral oil mixed with soil (top), saline solution (middle part) and soil sediment (bottom).

4) Vklop

Vzorec tal (10 g) smo suspendirali v 20 ml 0,9 % NaCl in primešali k 250 ml YMA + Ch gojišča (50 °C) ter ga razlili v petrijevke. Te smo inkubirali pri sobni temperaturi.

Gojišča

Po izolaciji smo kvasovke nacepili na različna gojišča v petrijevkah s premerom 10 cm, tako kot je prikazano v preglednici 4. Po začetni rasti smo jih precepili na gojišče YMA (Yeast-Mannitol agar; preglednica 4) do čistih kultur in preverili njihovo rast v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂.

1) Sestava gojišča YMA

V raziskavi smo uporabili štiri različne sestave gojišča YMA, ki so prikazane v preglednici 4. Gojišče YMA smo uporabili tako pri izolaciji kvasovk kot tudi kasneje za vzdrževanje rasti izoliranih kvasovk. Pripravljeno gojišče smo avtoklavirali pri temperaturi 121 °C, tlaku 1 bar, 15 min. dolgo.

Preglednica 4. Sestava gojišč YMA, ki smo jih uporabili pri izolaciji kvasovk.

Table 4. YMA media used in the study of yeast isolation.

	Kvasni ekstrakt (g l ⁻¹)	Sladni ekstrakt (g l ⁻¹)	Glukoza (g l ⁻¹)	Agar (g l ⁻¹)	Kloramfenikol (mg l ⁻¹)	pH
tekoče YMA (2%) + Ch*	3	3	20	/	150	3,5
YMA (1%) + Ch	3	3	10	20	150	4,5

*Ch – antibiotik kloramfenikol.

2) Sestava gojišča PDA

Gojišče PDA (Potato-Dextrose Agar) smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) in pred avtoklaviranjem dodali 0,05 g kloramfenikola l⁻¹ gojišča. Sledilo je 15 minutno avtoklaviranje pri temperaturi 121 °C in tlaku 1 bar.

3) Gojišče MY-10-12

Za pripravo enega litra gojišča MY-10-12 s kloramfenikolom smo uporabili 20 g sladnega ekstrakta, 5 g kvasnega ekstrakta (oba Biolife, Milano, Italija), 100 g natrijevega klorida, 120 g glukoze (oba Kemika, Zagreb, Hrvaška), 0,05 g antibiotika kloramfenikol (Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA) in 20 g agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) (Kurtzman,

2011). Pripravljeno gojišče smo 15 minut sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 pri tlaku 1 bar.

4) Gojišče YEPD

Gojišče YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) smo pripravili iz 1 g mesnega peptona (Merck, Darmstadt, Nemčija), 1 g kvasnega ekstrakta (Biolife, Milan, Italija), 10 g glukoze (Kemija, Zagreb, Hrvaška), 36 g natrijevega klorida (Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA), 20 g agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 0,05 g kloramfenikola (Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA) v enem litru vode (Kurtzman, 2011).

5) Gojišče DRBC

Gojišče DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Oxoid, Hampshire, VB) in mu dodali še 5 g agarja ter 0,05 g kloramfenikola (Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA).

Preglednica 5. Pregled izolacijskih tehnik, uporabljenih za izolacijo kvasovk.

Table 5. Overview of isolation techniques used for isolation of yeasts.

Vzorčenje	Izolacijska metoda	Uporabljena gojišča
november 2009	bogatitev	YMA (2 % glukoza) tekoče
	vklop	YMA (2 % glukoza) + EtOH tekoče
		YMA (1 % glukoza)
junij 2010	redčitev s fiziološko raztopino	MY-10-12
	flotacijska metoda	YMA
		YEPD
		PDA
		DRBC

3.5.3 Molekulska identifikacija kvasovk

Iz čistih kultur kvasovk smo izolirali DNK s kitom Prep Man Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems), kjer smo upoštevali protokol proizvajalca. Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili gene za rRNK velike podenote ribosoma (LSU rRNK; slika 1), in sicer domeno D1/D2. Produkte PCR smo poslali na sekvenciranje

v Macrogen Inc. (Nizozemska). Za identifikacijo kvasovk smo uporabili iskalni algoritem BLAST (Altschul in sod., 1990).

3.5.3.1 PCR protokol za gene rRNK za LSU

Reakcijska mešanica za PCR s končnim volumnom 35 μ l je vsebovala 0,5 μ l MgCl₂ (25 mM), 3,5 μ l pufru, 0,7 μ l dNTPs (10 mM, Applied Biosystems), 1,4 μ l začetnega oligonukleotida NL1 in 1,4 μ l začetnega oligonukleotida NL4, oba v koncentraciji 10 pmol μ l⁻¹ (O'Donnell, 1993), 0,18 μ l polimeraze Dream Taq (5 U μ l⁻¹, Fermentas) in 1 μ l izolirane DNK. Začetna denaturacija je trajala 2 min. na 95 °C, sledilo je 30 ciklov (45 sek. na 95 °C, 30 sek. na 52 °C in 120 sek. na 72 °C). Končno podaljševanje je potekalo 4 min. pri 72 °C.

3.5.4 Fermentacijski testi

Za potrditev hipoteze, da je sposobnost preživetja kvasovk v okolju s povečano koncentracijo CO₂ povezana s sposobnostjo fermentacije, smo preverili, ali so kvasovke, izolirane z območja s povečano koncentracijo CO₂, ki so sposobne rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂, tiste, ki so sposobne fermentacije glukoze do CO₂. Test smo izvedli v Durhamovih epruveh (slika 14), z 2 % (w/v) koncentracijo D-glukoze. Osnovno gojišče je bilo sestavljeno iz 4,5 g kvasnega ekstrakta, 7,5 g mesnega peptona ter 40 ml raztopine bromtimol (50 mg v 75 ml destilirane vode) v 1 l vode. Odpipetirali smo 9 ml osnovnega gojišča v velike epruvete z Durhamovimi cevkami, avtoklavirali in dodali 1 ml filtrirane (sterilizirane) glukoze raztopine (20 g D-glukoze v 100 ml vode). Na podlagi spremembe barve iz zelene v rumeno in prisotnosti plina v Durhamovih cevkah, smo določili sposobnost kvasovk za fermentacijo glukoze (slika 14).



Slika 14. Fermentacijski test. Rumena barva tekočega gojišča v epruveti prikazuje sposobnost kvasovk za fermentacijo glukoze, kar se kaže tudi v prisotnosti plina v Durhamovih cevkah.

Figure 14. Fermentation test. Yellow colour of liquid media in tubes is indicating the capability of yeasts to ferment glucose. In addition, glucose fermentation is indicated with the presence of gas in Durham tubes.

3.5.5 Asimilacijski testi za kvasovke

Za študije taksonomije kvasovk se poleg molekulskih markerjev ter fermentacijskih testov uporabljajo tudi asimilacijski testi, na podlagi katerih določimo sposobnost kvasovk za rast v medijih z različnimi viri ogljika in dušika. Asimilacijske teste smo izvedli na izolatu *Occultifur* species sp. nov., ki je bil po identifikaciji z algoritmom BLAST najbolj soroden kvasovki vrste *Occultifur externus*. Želeli smo dodatno argumentirati, da gre res za novo, do sedaj še neopisano vrsto kvasovke.

Pri asimilacijskih gojiščih je osnovno gojišče sestavljeno iz 1,34 g YNB (Yeast Nitrogen Bases; Sigma Chemical C., St. Luis, Mo., ZDA), 4 g agarja (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 180 ml destilirane vode. Po avtoklaviranju (121 °C, 1 bar, 15 min.) in ohlajanju na 50 °C se osnovnemu gojišču doda sterilizirano raztopino vira ogljika ali vira dušika.

- **Vir ogljika** se v končni koncentraciji 0,5 % pripravi tako, da se 1 g vira ogljika raztopi v 20 ml destilirane vode in se nato steriliziranega (filtracija skozi filter s porami 0,22 µm) doda k osnovnemu mediju.

Uporabljeni viri ogljika so :

D-glukoza
 D-galaktoza
 L-sorboza
 D-glukozamin hidroklorid
 D-riboza
 L-arabinoza
 L-ramnoza
 D (+) trehaloza
 D (+) celobioza
 D (+) melibioza
 rafinoza
 škrob
 glicerol
 adonitol (ribitol)
 D-manitol
 myo-inozitol
 sukcinat
 citrat
 dulcitol (galactitol)
 fruktoza
 D-sorbitol
 D-glukuronska kislina (glukuronat)

- Osnovnemu gojišču za asimilacijske teste se po avtoklaviranju doda filtrsko steriliziran **vir dušika**, v koncentracijah prikazanih v preglednici 6.

Preglednica 6. Viri dušika, uporabljenega pri asimilacijskih testih.

Table 6. Sources of nitrogen used in assimilation tests.

Vir dušika	Masa potrebna za 200 ml (g)
nitrat (KNO ₃)	0,156
nitrit (NaNO ₂)	0,052
L-lizin	0,112

- Dodatno smo preverili tudi rast kvasovke *Occultifur species sp. nov.* na gojišču z dodanim 5 % NaCl in 10 % NaCl.
- Testirali smo tudi rast na glukoznem gojišču pri različnih temperaturah. Glukozno gojišče je bilo pripravljeno tako, kot je opisano v poglavju 3.5.5. Sposobnost rasti smo opazovali pri temperaturah 5 °C, 15 °C, 25 °C in 37 °C.
- API 20C AUX test sevov *Occultifur species sp. nov.*

Poleg asimilacijskih testov na gojiščih, ki smo jih pripravili sami, smo dodatno izvedli tudi asimilacijski test s komercialnim kitom API 20C AUX (bioMérieux SA, Francija).

V komoro API 20C AUX smo odpipetirali 5 ml sterilne destilirane vode. Polno zanko kolonij za vsak sev *Occultifur species sp. nov.* smo suspendirali v 0,9 % NaCl in 100 µL inokuluma odpipetirali v raztopino C (tekoči medij) ter z njo napolnili vdolbinice testa. Test smo inkubirali pri 25 °C 3 dni.

3.5.6 Tvorba škroba

Sposobnost tvorbe škroba kvasovke *Occultifur species sp. nov.* smo preverili na gojišču z glukozo, kjer smo po 9-dnevni inkubaciji na 25 °C dodali jod in ocenili spremembo iz vijolične (ne tvori škroba) v rumeno (tvori škrob).

3.5.7 Ugotavljanje ureazne aktivnosti sevov *Occultifur species sp. nov.*

S testom dokazujemo aktivnost encima ureaza, ki cepi ureo v amoniak in ogljikov dioksid. Seve kvasovke *Occultifur species sp. nov.* smo nacepili po sredini poševne ploskve gojišča s sečnino po Christensenu. Če se gojišče obarva rožnato, to pomeni prisotnost ureaze, če se barva gojišča ne spremeni, torej ostane rumena, pomeni, da ureaza ni prisotna.

3.5.8 Parjenje in sporulacija *Occultifur species sp. nov.*

Test parjenja med različnimi sevi kvasovke *Occultifur species sp. nov.* smo izvedli na gojiščih CMA, SG in tudi PDA in MEA (Kurtzman, 2011) in po dveh mesecih inkubacije

na 37 °C preverili, če so na mikroskopskih preparatih vidne hife, ki kažejo na uspešno parjenje.

3.5.9 Velikost posameznih celic *Occultifur species sp. nov.*

Velikost posameznih celic smo v vodni raztopini izmerili s programsko opremo cell[^]B (Olympus) pod mikroskopom.

3.5.10 Bioinformatika

Kakovost sekvenc smo pregledali in pri tem odstranili sekvence začetnih oligonukleotidov. Sekvence smo primerjali z bazo podatkov NCBI, in sicer z uporabo iskalnega algoritma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul in sod., 1990). Z uporabo iskalnega algoritma BLAST (Altschul in sod., 1990) smo primerjali sekvence kvasovke *Occultifur species sp. nov.* iz naše raziskave z najbližjimi filogenetskimi sorodniki, prisotnimi v bazi NCBI.

Za izdelavo filogenetskega drevesa smo sekvence poravnali z uporabo metode ClustalW (Thompson in sod., 1997). Filogenetsko drevo smo sestavili z uporabo stohastičnega modela za zamenjavo nukleotidov Jukes-Cantor (Jukes in Cantor, 1969), distančne metode združevanja najbližjega soseda »neighbor-joining« in z metodo vezanja »bootstrap« na podlagi 1000 permutacij. Vse filogenetske analize smo izvedli s programom Geneious verzija 5.5.7 (Drummond in sod., 2011).

4 REZULTATI

4.1 ABIOTSKI DEJAVNIKI OKOLJA

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati meritev koncentracij CO₂ in O₂ v talnem zraku ter rezultati standardnih pedoloških analiz. Rezultati so prikazani v ločenih sklopih za arbuskularne mikorizne (AM) glive, arheje in bakterije ter za kvasovke. V sklopu rezultatov o AM glivah so predstavljeni tudi vremenski podatki za območje mofet v okolici Stavešincev ter rezultati popisa rastlin iz območja travniške mofete v okolici Stavešincev.

4.1.1 Okoljski podatki, uporabljeni za raziskave združb AM gliv

Med aprilom in oktobrom 2010 in med aprilom in oktobrom 2011 smo na območju travniške mofete v okolici Stavešincev vzorčili tla in korenine rastlin za kasnejše analize sestave združb AM gliv v rastlinskih koreninah (glej poglavje 3.3.1).

Talni vzorci za pedološko analizo so bili vzorčeni istočasno kot korenine rastlin za analizo biodiverzitete AM gliv, prav tako so bile opravljene meritve koncentracije plinov v tleh za vsak posamezen vzorec. Rezultati pedološke analize talnih vzorcev so bili uporabljeni pri analizi vpliva abiotских dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv. Rezultati kažejo, da se povprečne vrednosti razpoložljivega fosforja (P₂O₅) in skupnega dušika (N) niso statistično značilno razlikovale med območji z visoko koncentracijo talnega CO₂ in kontrolnimi območji (preglednica 7), medtem ko lahko pri pH vrednosti opazimo statistično značilne razlike v juniju (2010), aprilu (2011) in avgustu (2011). Koncentraciji CO₂ in O₂ v talnem zraku sta bili statistično značilno različni med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji pri vseh vzorčenih terminih (preglednica 7).

Preglednica 7. Podatki o lastnostih tal travniške mofete v okolici Stavešincev, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na biodiverzitetu AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 4$). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test).

Table 7. Soil characteristics data of the high CO₂ and control CO₂ exposed soils for the meadow mofette near Stavešinci, used in the study of the impact of abiotic environmental factors on biodiversity of AM fungi: soil pH, available phosphorus (P₂O₅), total nitrogen (N), % (v/v) carbon dioxide (CO₂) and % (v/v) oxygen (O₂) in soil air. Values are means ± standard deviation ($n = 4$). Significant differences between high and control CO₂ exposed samples are indicated in boldface ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

		pH	P ₂ O ₅ mg/100g	Skupni N %	CO ₂ %	O ₂ %
2010						
april	kontrola	4,8 ± 0,5	7,6 ± 4,6	0,32 ± 0,05	0,9 ± 0,5	20,0 ± 0,2
	visok CO ₂	4,3 ± 0,2	11,6 ± 5,4	0,35 ± 0,06	59,2 ± 18,2	8,2 ± 3,0
junij	kontrola	4,7 ± 0,5	7,6 ± 3,5	0,32 ± 0,06	1,1 ± 1,0	19,2 ± 0,7
	visok CO ₂	4,2 ± 0,1	12,2 ± 5,3	0,37 ± 0,09	61,8 ± 11,6	7,0 ± 1,8
avgust	kontrola	5,0 ± 0,8	7,8 ± 5,3	0,29 ± 0,06	0,6 ± 0,3	19,4 ± 0,2
	visok CO ₂	4,2 ± 0,2	14,5 ± 6,6	0,35 ± 0,08	67,3 ± 15,3	7,7 ± 2,3
oktober	kontrola	4,9 ± 0,7	9,2 ± 4,2	0,30 ± 0,07	0,6 ± 0,3	20,3 ± 0,4
	visok CO ₂	4,2 ± 0,2	14,4 ± 6,6	0,33 ± 0,06	75,7 ± 19,4	7,5 ± 5,0
2011						
april	kontrola	4,8 ± 0,4	8,2 ± 6,0	0,31 ± 0,08	1,0 ± 0,6	19,8 ± 0,5
	visok CO ₂	4,2 ± 0,2	11,7 ± 5,5	0,33 ± 0,05	64,2 ± 11,9	9,6 ± 3,0
junij	kontrola	4,7 ± 0,5	6,1 ± 3,7	0,30 ± 0,07	1,6 ± 0,7	18,8 ± 0,6
	visok CO ₂	4,2 ± 0,2	12,3 ± 5,0	0,35 ± 0,04	73,2 ± 14,9	7,0 ± 2,7
avgust	kontrola	4,8 ± 0,4	8,3 ± 4,3	0,33 ± 0,09	0,5 ± 0,3	19,3 ± 0,6
	visok CO ₂	4,0 ± 0,2	17,8 ± 10,5	0,41 ± 0,04	68,5 ± 17,2	7,2 ± 3,5
oktober	kontrola	4,6 ± 0,6	8,7 ± 4,1	0,31 ± 0,05	0,6 ± 0,6	20,7 ± 0,2
	visok CO ₂	4,0 ± 0,2	16,3 ± 6,9	0,34 ± 0,06	73,2 ± 14,3	10,0 ± 3,4

Vremenski podatki (preglednica 8), izmerjeni za obdobje vzorčenja med aprilom 2010 in oktobrom 2011 iz 8 km oddaljene vremenske postaje Gornja Radgona. Pridobljeni so bili s spletne strani Agencije Republike Slovenije za Okolje (ARSO; <http://www.arso.gov.si>). Da bi lahko preučili potencialne povezave med sestavo združb AM gliv in vremenskimi razmerami, smo upoštevali 30-dnevno povprečje, ki se konča na zadnji dan vzorčenja za posamezni mesec. V analizah upoštevani vremenski parametri so: maksimalna temperatura zraka, minimalna temperatura zraka, sončno obsevanje in skupna količina padavin 30-dnevnega obdobja (preglednica 8).

Preglednica 8. Vremenski podatki za mofete v okolici Stavešincev, pridobljeni iz vremenske postaje Gornja Radgona, uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na biodiverzitetu AM gliv. Prikazana so povprečja (\pm SO) za 30-dnevno obdobje, ločeno za maksimalno T, minimalno T in sončno obsevanje, ki se zaključijo na zadnji dan vsakega vzorčenja (4. 5., 30. 6., 18. 8., 29. 10. 2010 in 20. 4., 29. 6., 26. 8., 26. 10. 2011), in skupna količina padavin za to 30-dnevno obdobje.

Table 8. Climate variables for Stavešinci mofette, obtained from Gornja Radgona weather station, used in the study of the impact of abiotic environmental factors on biodiversity of AM fungi. Presented is average (\pm SD) of 30 days, separately for T maximal, T minimal and sun hours, finishing on the last day of each sampling (4. 5., 30. 6., 18. 8., 29. 10. 2010 and 20. 4., 29. 6., 26. 8., 26. 10. 2011) and sum of rainfall for this 30-day period.

	Maksimalna T (°C)	Minimalna T (°C)	Sončno obsevanje (h)	Vsota dežja (mm)
april 2010	17,8 \pm 5,0	6,2 \pm 3,7	6,2 \pm 4,4	36,8
april 2011	18,6 \pm 3,9	3,5 \pm 2,9	7,2 \pm 3,6	19,6
junij 2010	25,0 \pm 5,2	13,7 \pm 2,9	7,9 \pm 5,8	86,4
junij 2011	25,9 \pm 2,6	13,6 \pm 2,2	8,8 \pm 4,2	88,0
avgust 2010	26,4 \pm 3,2	15,0 \pm 1,7	7,1 \pm 3,9	123,4
avgust 2011	27,9 \pm 3,7	15,2 \pm 2,2	8,9 \pm 3,8	97,6
oktober 2010	13,3 \pm 2,9	4,0 \pm 4,3	3,1 \pm 3,1	46,7
oktober 2011	17,7 \pm 6,6	4,8 \pm 4,4	6,0 \pm 4,2	84,2

Preglednica 9. Popis rastlin iz talnih izvrtkov, vzorčenih na travniški mofeti. Rastline, ki so se pojavile samo na enem izmed območij (visok CO₂ ali kontrola), so označene z odebeljenim besedilom.

Table 9. Botanical survey conducted at meadow mofette. Plant species, found only at one CO₂ regime (high CO₂ or control), are indicated in bold.

Območje z visokim CO₂	Kontrolno območje
<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Achillea millefolium</i> L.
<i>Agrostis canina</i> L.	<i>Agrostis canina</i> L.
<i>Agrostis stolonifera</i> L.	<i>Agrostis stolonifera</i> L.
<i>Betonica officinalis</i> L.	<i>Ajuga reptans</i> L.
<i>Carex hirta</i> L.	<i>Carex hirta</i> L.
<i>Centaurea jacea</i> L.	<i>Centaurea jacea</i> L.
<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.	<i>Cerastium glomeratum</i> Thuill.
<i>Juncus conglomeratus</i> L.	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
<i>Juncus effusus</i> L.	<i>Dactylis glomerata</i> L.
<i>Leontodon autumnalis</i> L.	<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) PB
<i>Leontodon hispidus</i> L.	<i>Erigeron annuus</i> (L.) Pers.
<i>Lotus corniculatus</i> L.	<i>Galium verum</i> L.
<i>Lythrum salicaria</i> L.	<i>Holcus lanatus</i> L.
<i>Plantago lanceolata</i> L.	<i>Juncus conglomeratus</i> L.
<i>Poa annua</i> L.	<i>Juncus effusus</i> L.
<i>Poa pratensis</i> L.	<i>Lathyrus pratensis</i> L.
<i>Polygonum arenastrum</i> Boreau	<i>Leontodon hispidus</i> L.
<i>Polygonum aviculare</i> L.	<i>Leucanthemum ircutianum</i> (Turcz.) DC.
<i>Ranunculus repens</i> L.	<i>Lotus corniculatus</i> L.
<i>Scirpus sylvaticus</i> L.	<i>Lycopus europaeus</i> L.
<i>Solidago gigantea</i> Aiton	<i>Lysimachia nummularia</i> L.
<i>Taraxacum officinale</i> Weber in Wiggers	<i>Lysimachia vulgaris</i> L.
<i>Trifolium pratense</i> L.	<i>Plantago lanceolata</i> L.
<i>Trifolium repens</i> L.	<i>Poa pratensis</i> L.
<i>Veronica officinalis</i> L.	<i>Ranunculus repens</i> L.
<i>Vicia</i> sp.	<i>Scirpus sylvaticus</i> L.
	<i>Solidago gigantea</i> Aiton

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 9: Popis rastlin iz talnih izvrtkov, vzorčenih na travniški mofeti. Rastline, ki so se pojavile samo na enem izmed območij (visok CO₂ ali kontrola), so označene z odebelenim besedilom

Območje z visokim CO ₂	Kontrolno območje
	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.
	<i>Tanacetum vulgare</i> L.
	<i>Taraxacum officinale</i> Weber in Wiggers
	<i>Trifolium pratense</i> L.
	<i>Trifolium repens</i> L.
	<i>Veronica acinifolia</i> L.
	<i>Veronica persica</i> Poir.

Na enak način kot na območju travniških mofet smo vzorčili tudi talne vzorce na območju gozdnih mofet na Staveškem vrhu. Rezultati pedološke analize talnih vzorcev za leto 2010 so bili uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv na večji prostorski skali (primerjava razlik med bolj oddaljenimi mofetami). Rezultati kažejo, da se povprečne vrednosti pH, razpoložljivega fosforja in skupnega dušika niso statistično značilno razlikovale med območji z visoko koncentracijo talnega CO₂ in kontrolnimi območji (preglednica 10). Koncentracija CO₂ in O₂ v talnem zraku je bila statistično značilno različna med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji pri vseh vzorčenjih (preglednica 10).

Preglednica 10. Podatki o lastnostih tal gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na biodiverzitetno AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 4$). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test).

Table 10. Soil characteristics data of high CO₂ and control CO₂ exposed soils for the forest mofettes at Stavešinski vrh, used in the study of the impact of abiotic environmental factors on biodiversity of AM fungi: soil pH, available phosphorus (P₂O₅), total nitrogen (N), % (v/v) carbon dioxide (CO₂) and % (v/v) oxygen (O₂) in soil air. Values are means ± standard deviation ($n = 4$). Significant differences between high and control CO₂ exposed samples are indicated in boldface ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

		pH	P ₂ O ₅	Skupni N	CO ₂	O ₂
2010			mg/100g	%	%	%
april	kontrola	3,5	5,5	0,38	0,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1
	visok CO ₂	3,4	36,9	0,92	91,9 ± 5,8	3,3 ± 1,7
junij	kontrola	3,5	5,8	0,34	0,5 ± 0,3	19,8 ± 0,4
	visok CO ₂	3,5	42,5	0,71	89,5 ± 8,4	3,1 ± 1,4
avgust	kontrola	3,4	9,1	0,51	0,8 ± 0,2	20,1 ± 0,1
	visok CO ₂	3,7	96,8	0,44	78,6 ± 22,1	5,1 ± 3,9
oktober	kontrola	3,6	5,4	0,31	1,0 ± 0,1	20,3 ± 0,1
	visok CO ₂	3,7	76,3	0,61	97,0 ± 3,7	4,8 ± 2,3
2011						
april	kontrola				0,5 ± 0,2	20,3 ± 0,1
	visok CO ₂				72,5 ± 4,3	12,5 ± 0,9
junij	kontrola				1,2 ± 0,3	20,3 ± 0,2
	visok CO ₂		ni meritev		85,8 ± 12,9	6,5 ± 4,1
avgust	kontrola				0,5 ± 0,1	20,0 ± 0,2
	visok CO ₂				91,4 ± 12,4	3,0 ± 2,0
oktober	kontrola				0,6 ± 0,2	20,6 ± 0,2
	visok CO ₂				77,4 ± 5,1	12,5 ± 1,3

Rezultati pedološke analize talnih vzorcev, vzorčenih maja 2008 na območju čeških mofet, so bili prav tako uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na sestavo združbe AM gliv na večji prostorski skali (primerjava mofet med različnimi državami). Vzorčenje tal je bilo opravljeno istočasno kot vzorčenje korenin rušate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.) (Kosi, 2012). Rezultati kažejo na statistično značilne razlike pri vrednostih vseh lastnosti tal, med območji z visoko koncentracijo CO₂ in

kontrolnimi območji (preglednica 11), medtem ko Kosi (2012) poroča o statistično značilni korelaciji med koncentracijo CO₂ v tleh in koncentracijo O₂ v tleh in vsebnostjo organske snovi v tleh, ter vsebnosti ogljika in dušika v tleh.

Preglednica 11. Podatki o lastnostih tal čeških mofet, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na biodiverzitetu AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 6$ ponovitev za kontrolna območja in $n = 8$ ponovitev za območja z visoko koncentracijo CO₂). Statistično značilne razlike med vrednostmi z območij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test).

Table 11. Soil characteristics data of high CO₂ and control CO₂ exposed soils for the Czech mofettes, used in the study of the impact of abiotic environmental factors on biodiversity of AM fungi: soil pH, available phosphorus (P₂O₅), total nitrogen (N), % (v/v) carbon dioxide (CO₂) and % (v/v) oxygen (O₂) in soil air. Values are means ± standard deviation ($n = 6$ replicates for control samples and $n = 8$ replicates for high CO₂ samples). Significant differences between high and control CO₂ exposed samples are indicated in boldface ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

	pH	P₂O₅	Skupni N	CO₂	O₂
	v CaCl₂	mg/100g	%	%	%
kontrola	4,4 ± 0,4	9,7 ± 2,3	0,44 ± 0,17	0,8 ± 0,6	18,8 ± 1,5
visok CO ₂	3,9 ± 0,2	14,6 ± 5,1	1,15 ± 0,26	78,7 ± 20,7	5,5 ± 4,4

Talni vzorci iz italijanske mofete Bossoleto so bili vzorčeni v juniju 2008, istočasno kot korenine posamičnih rastlin (*Agrostis stolonifera* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud., *Plantago lanceolata* L., *Centaurea alba* L.). Tudi ti rezultati pedološke analize talnih vzorcev (preglednica 12) so bili uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv na večji prostorski skali. Rezultati pedološke analize so pokazali statistično značilne razlike samo pri vrednosti pH tal na rastiščih vrste *Centaurea alba*, med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji. Iztok (fluks) CO₂ je bil statistično značilno različen med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji pri vseh vzorčenih rastlinah (preglednica 12).

Preglednica 12. Podatki o lastnostih tal na območju italijanskih mofet, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N) in tok (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) ogljikovega dioksida (CO₂). Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon (visok CO₂: n = 3 pri talnih vzorcih rizosfere *Agrostis stolonifera*, n = 4 za *Phragmites australis*, n = 4 za *Plantago lanceolata*, n = 3 za *Centaurea alba*; kontrolno območje: n = 4 za *Agrostis stolonifera*, n = 2 za *Phragmites australis*, n = 3 za *Plantago lanceolata*, n = 3 za *Centaurea alba*). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test).

Table 12. Soil characteristics data of high CO₂ and control CO₂ exposed soils for the Italian mofette, used in the study of the impact of abiotic environmental factors on community structure of AM fungi: soil pH, available phosphorus (P₂O₅), total nitrogen (N) and flux (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) of carbon dioxide (CO₂). Values are means ± standard deviation (high CO₂: n = 3 for *Agrostis stolonifera*, n = 4 for *Phragmites australis*, n = 4 for *Plantago lanceolata*, n = 3 for *Centaurea alba*; control location: n = 4 for *Agrostis stolonifera*, n = 2 for *Phragmites australis*, n = 3 for *Plantago lanceolata*, n = 3 for *Centaurea alba*). Significant differences between high and control CO₂ exposed samples are indicated in boldface ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

Rizosfera rastline	pH v CaCl ₂	P ₂ O ₅ mg / 100 g	Skupni N %	CO ₂ μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹ .
<i>Agrostis stolonifera</i>				
kontrola	6,5 ± 0,2	24,6 ± 11,8	2,19 ± 0,10	16,05 ± 2,32
visok CO ₂	6,5 ± 0,1	32,7 ± 15,0	1,73 ± 0,65	171,56 ± 59,89
<i>Phragmites australis</i>				
kontrola	6,6 ± 0,3	55,7	1,00 ± 0,15	21,93 ± 5,64
visok CO ₂	4,2 ± 0,8	107,5 ± 14,9	0,99 ± 0,42	269,83 ± 49,44
<i>Plantago lanceolata</i>				
kontrola	7,0 ± 0,2	32,0 ± 14,2	1,32 ± 0,32	15,10 ± 8,33
srednji CO ₂	6,7 ± 0,3	19,4 ± 17,1	1,33 ± 0,52	40,70 ± 7,74
<i>Centaurea alba</i>				
kontrola	7,0 ± 0,2	32,0 ± 14,2	1,32 ± 0,32	20,50 ± 3,54
visok CO ₂	6,5 ± 0,1	32,7 ± 15,0	1,73 ± 0,65	169,72 ± 55,96

4.1.2 Okoljski podatki, uporabljeni za raziskave združb arhej in bakterij

Za analizo vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb arhej in bakterij smo vzorčili tla za pedološke analize med aprilom in avgustom 2010 na območju travniških mofet v okolici Stavešincev (preglednica 13), in sicer iz območja, kjer smo novembra 2009 vzorčili tla za analizo talne biodiverzitete arhej, bakterij in kvasovk. Rezultati analiz kažejo, da se koncentracija CO₂ in O₂ v talnem zraku, vsebnost razpoložljivega fosforja (P₂O₅) in vsebnost skupnega dušika (N) statistično značilno razlikuje med območji z visoko koncentracijo CO₂ in območji s srednjimi in kontrolnimi koncentracijami CO₂. Vrednost pH in vsebnost vode v tleh (WHC) je bila značilno različna med vsemi tremi območji (z visoko in srednjo koncentracijo CO₂ ter kontrolo).

Preglednica 13. Podatki o lastnostih tal na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, izpostavljenih visoki, srednji in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljeni pri analizi vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb arhej in bakterij: prikazani so % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in kisika (O₂) v zraku, pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N) in zadrževalna kapaciteta tal (WHC). Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon. Povprečne vrednosti v isti vrstici brez enake skupne črkovne oznake (a, b, c) so med seboj statistično različne ($P < 0,05$; test mnogoterih primerjav Tukeyevi kontrasti).

Table 13. Soil characteristics data of high CO₂, medium CO₂ and control CO₂ exposed soils from meadow mofettes near Stavešinci, used in the study of the impact of abiotic environmental factors on community structure of archaea and bacteria: % (v/v) carbon dioxide (CO₂) and % (v/v) oxygen (O₂) in soil air, soil pH, available phosphorus (P₂O₅), total nitrogen (N) and water holding capacity (WHC) of soil are presented. Values are means ± standard deviation. Means within a row without common superscript letter (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Tukey's contrasts.

		Visok CO ₂	Srednji CO ₂	Kontrola
CO ₂ (%)	(n = 9)	85,5 ± 21,7 ^a	13,8 ± 3,2 ^b	0,2 ± 0,0 ^b
O ₂ (%)	(n = 9)	4,4 ± 4,5 ^a	18,6 ± 0,5 ^b	21,0 ± 0,1 ^b
pH (CaCl ₂)	(n = 4)	4,2 ± 0,1 ^a	4,4 ± 0,1 ^b	5,4 ± 0,1 ^c
P ₂ O ₅ (mg 100g ⁻¹)	(n = 4)	15,5 ± 2,2 ^a	5,6 ± 0,8 ^b	3,6 ± 0,7 ^b
skupni N (%)	(n = 4)	0,31 ± 0,01 ^a	0,40 ± 0,02 ^b	0,38 ± 0,01 ^b
WHC (g _{voda} /g _{tla})	(n = 9)	0,41 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,00 ^b	0,49 ± 0,01 ^c

4.1.3 Okoljski podatki, uporabljeni za raziskave biodiverzitet kvasovke

Za analizo biodiverzitet kvasovk smo vzorčili tla novembra 2009 (glej poglavje 4.1.2) in junija 2010 (preglednica 14) na območju travniške mofete v okolici Stavešincev. Koncentraciji CO₂ in O₂ v talnem zraku sta bili statistično značilno različni med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnim območjem (preglednica 14).

Preglednica 14. Podatki o lastnostih tal na območju travniške mofete v okolici Stavešincev za mesec junij 2010, izpostavljenih visoki in kontrolni koncentraciji CO₂, uporabljenih pri analizi biodiverzitet kvasovk: prikazani so pH tal, razpoložljivi fosfor (P₂O₅), skupni dušik (N), % (v/v) ogljikovega dioksida (CO₂) in % (v/v) kisika (O₂) v zraku. Podane vrednosti so povprečja ± standardni odklon ($n = 4$). Statistično značilne razlike med vrednostmi iz lokacij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ so označene odebeljeno ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test).

Table 14. Soil characteristics data of high CO₂ and control CO₂ exposed soils for the meadow mofette, used in the biodiversity analysis of yeasts: soil pH, available phosphorus (P₂O₅), total nitrogen (N), % (v/v) carbon dioxide (CO₂) and % (v/v) oxygen (O₂) in soil air. Values are means ± standard deviation ($n = 4$). Significant differences between high and control CO₂ exposed samples are indicated in boldface ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

	pH v CaCl ₂	P₂O₅ mg/100g	Skupni N %	CO₂ %	O₂ %
kontrola	4,4	10,6	0,27	2,6 ± 0,8	20,0 ± 0,0
visok CO ₂	4,1	13,3	0,32	99,9 ± 0,0	1,4 ± 0,4

4.2 RAZISKAVE KOLONIZACIJE KORENIN, SESTAVE ZDRUŽB IN DIVERZITETE AM GLIV NA OBMOČJIH MOFET

4.2.1 Kolonizacija korenin rastlin z AM glivami

Za oceno kolonizacije korenin z AM glivami smo vzorčili korenine rastlin (mešan vzorec korenin več rastlinskih vrst) med aprilom in oktobrom v letu 2010 na območju travniških mofet v okolici Stavešincev. Analizirali smo po 5 korenin dolžine 1 cm za vsako mofeto (Mofeta 1, Mofeta 2, Mofeta 3) znotraj posameznega območja (visok CO₂, kontrola), torej skupno 20 korenin za vsak termin vzorčenja za območje z visoko koncentracijo CO₂ in za kontrolno območje (preglednica 15). Kolonizacija korenin z AM glivami se ni statistično značilno (Kruskal-Wallisov test) razlikovala med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji (preglednica 15).

Preglednica 15. Ocena kolonizacije korenin rastlin z AM glivami. V kolonizaciji korenin ni bilo statistično značilnih razlik med rastlinami z območij z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ ($P > 0,05$; Kruskal-Wallisov test).

Table 15. Scoring results of plant root colonization with AM fungi. No significant differences in AM fungal root colonisation between high and control CO₂ exposed samples was observed ($P > 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test).

	Območje	April	Junij	Avgust	Oktober
frekvenca delov korenine z glivo (F %)	visok CO ₂	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	kontrola	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
intenziteta mikorize (M %)	visok CO ₂	47,27 ± 6,81	41,81 ± 7,45	42,39 ± 10,10	34,06 ± 14,48
	kontrola	53,79 ± 6,58	46,13 ± 9,14	45,24 ± 3,58	42,47 ± 9,72
intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenine (m %)	visok CO ₂	47,27 ± 6,82	41,81 ± 7,45	42,39 ± 10,10	34,06 ± 14,48
	kontrola	53,79 ± 6,58	46,13 ± 9,14	45,24 ± 3,58	42,47 ± 9,72
gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo (a %)	visok CO ₂	31,21 ± 16,15	35,02 ± 16,72	26,42 ± 6,95	29,23 ± 14,90
	kontrola	47,73 ± 14,78	43,21 ± 16,76	42,57 ± 15,07	37,78 ± 16,06
gostota arbuskulov v koreninski skorji (A %)	visok CO ₂	15,16 ± 9,43	15,40 ± 9,38	11,65 ± 5,88	10,55 ± 8,89
	kontrola	26,22 ± 10,19	20,73 ± 11,97	19,60 ± 8,53	10,42 ± 7,72

4.2.2 Sestava združb AM gliv

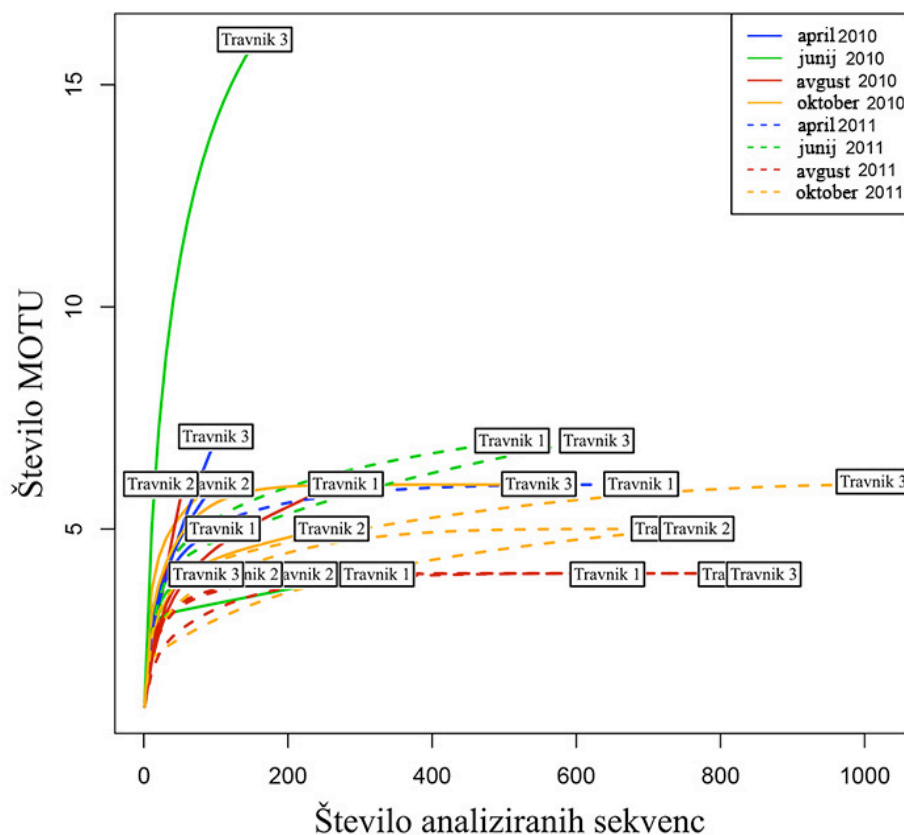
Na podlagi rezultatov sekvenciranja smo z uporabo programa QIIME (Caporaso in sod., 2010) analizirali skupno 62.733 sekvenc iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev, gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, italijanskih mofet Bossoleto in čeških mofet v okolici Cheba. Za preučevanje razlik v sestavi združb AM gliv med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji smo prvotne sekvence na podlagi 10 baznih parov dolgih sekvenc ločevalcev MID (multiplex identifiers, Roche) dodelili posameznim vzorcem, odstranili smo himerne sekvence ter sekvence krajše od 400 baznih parov in sekvence daljše od 650 baznih parov (glej poglavje 3.3.4). Nato smo odstranili še sekvence ločevalcev MID in sekvence začetnih oligonukleotidov ter sekvence, ki niso pripadale AM glivam. Tako smo dobili skupno 37 molekularnih operativnih taksonomskih enot (MOTU) s skupno 37.757 sekvencami AM gliv dolžine med 400 in 650 baznih parov, oziroma 32 MOTU s skupno 25.685 sekvenc (iz 44 vzorcev mešanih korenin več rastlinskih vrst) na območju travniških mofet v okolici Stavešincev. Sledila so območja gozdnih mofet (6.776 sekvenc iz 14 vzorcev mešanih korenin več rastlinskih vrst), italijanskih mofet (4.368 sekvenc iz 8 vzorcev korenin posamezne vrste rastlin, ločeno za posamezno rastlinsko vrsto in za območje z različno koncentracijo CO₂), in čeških mofet (928 sekvenc iz 2 združenih vzorcev, ločeno za visok CO₂ in kontrolo, korenine vrste *Deschampsia caespitosa*).

4.2.2.1 Krivulje redčenja vrst in krivulje kopičenja vrst za podatke iz območja travniških mofet

Tekom vzorčenja v letu 2010 smo opazili statistično značilno razliko v številu sekvenc AM gliv med območji z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ (Kruskal-Wallisov test; $\chi^2 = 14,5$, s.p. = 1, $P = 0,000$), kjer so razlike izvirale predvsem iz aprilskega (Kruskal-Wallisov test; $\chi^2 = 3,97$, s.p. = 1, $P = 0,046$) in junijskega vzorčenja (Kruskal-Wallisov test; $\chi^2 = 3,9$, s.p. = 1, $P = 0,0495$). Statistično značilnih razlik v številu sekvenc med območji z visoko in kontrolno koncentracijo CO₂ za vzorčenje v letu 2011 ni bilo (Kruskal-Wallisov test; $\chi^2 = 1,1$, s.p. = 1, $P = 0,29$).

Z vizualno oceno krivulj redčenja vrst, s katerimi generiramo pričakovano število vrst znotraj majhnega območja, ločeno za območje z visokim CO₂ in kontrolno območje (slika 15), smo potrdili, da se je večina krivulj približala asimptoti. Predvsem je bilo to značilno za tiste, kjer je bilo več kot 200 sekvenc v posameznem MOTU.

a) območje z visoko koncentracijo CO₂



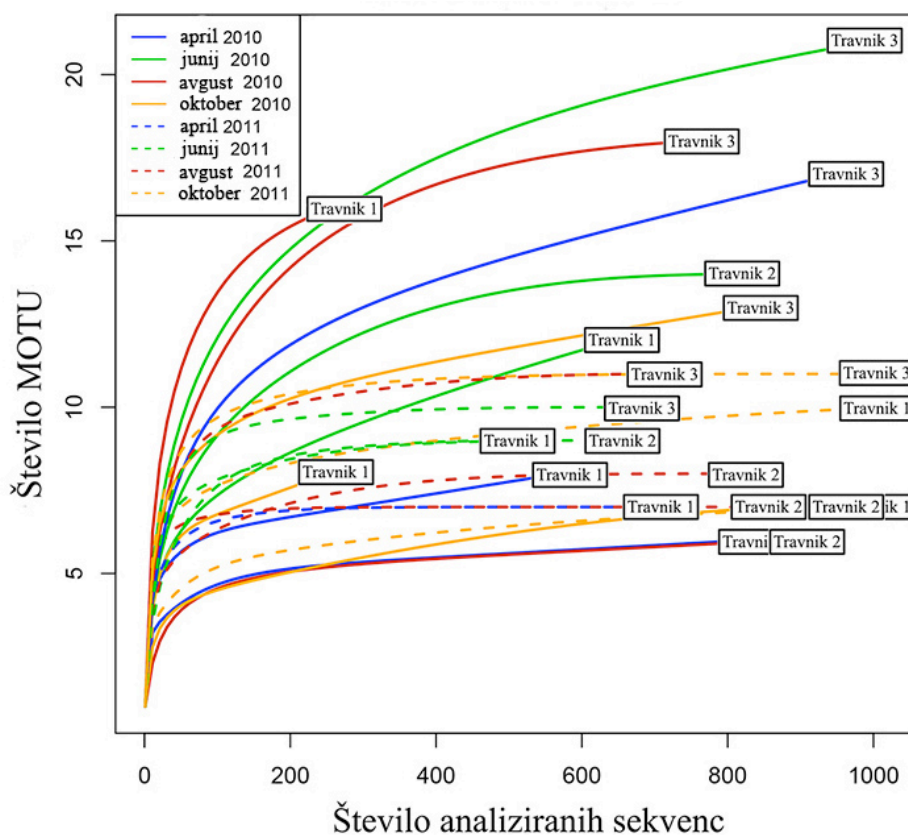
Slika 15. Krivulja redčenja MOTU (število MOTU v odvisnosti od števila analiziranih sekvenc) posameznih vzorcev iz območja travniških mofet, z lokacijo vzorčenja, prikazano ob koncu vsake krivulje. Lokacija Travnik 1 ustreza Mofeti 1, lokacija Travnik 2 ustreza Mofeti 2 in lokacija Travnik 3 ustreza Mofeti 3, vse iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Polna linija prikazuje vzorčenje v letu 2010, prekinjena linija pa vzorčenje v letu 2011. Različne barve krivulj prikazujejo različne mesece vzorčenja, modra za aprilsko, zelena za junijsko, rdeča za avgustovsko in rumena za oktobrsko vzorčenje. MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 97 % podobnosti.

Figure 15. MOTU rarefaction curves (number of MOTU based on the number of analysed sequences) of each sample from meadow mofette, location of sampling is shown next to the corresponding curve. Location Travnik 1 corresponds to Mofette 1, location Travnik 2 corresponds to Mofette 2, location Travnik 3 corresponds to Mofette 3, all sampled within meadow mofette near Stavešinci. Full line corresponds to 2010 samples, broken line to 2011 samples, with different colour of curves for each month sampled, blue for April, green for June, red for August and yellow for October sampling. MOTU represent sequences clustered at 97 % sequence similarity.

se nadaljuje

nadaljevanje

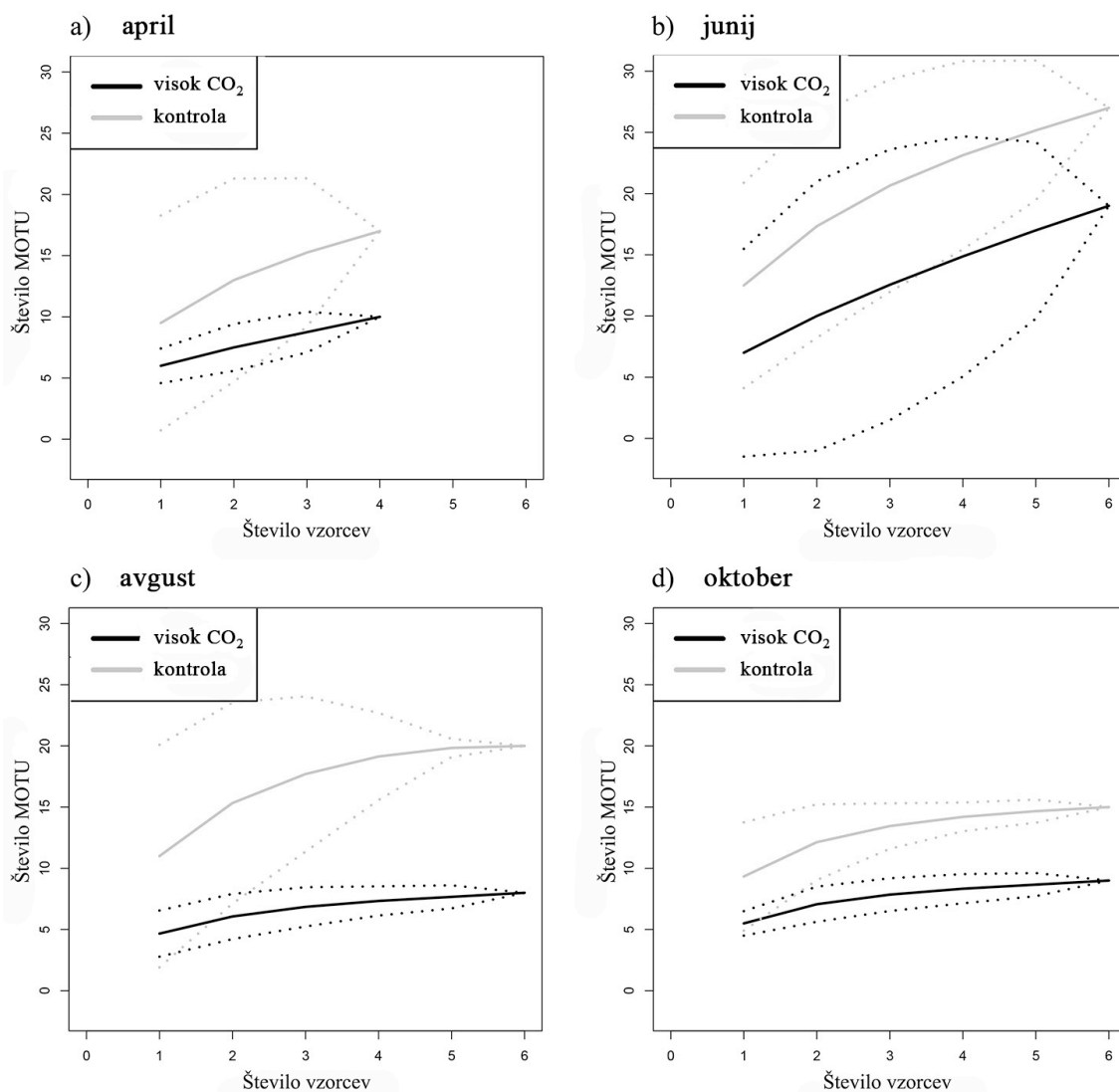
b) kontrolno območje



Slika 16. Krivulja redčenja MOTU (število MOTU v odvisnosti od števila analiziranih sekvenc) posameznih vzorcev iz območja travniških mofet, z lokacijo vzorčenja, prikazano ob koncu vsake krivulje. Lokacija Travnik 1 ustreza Mofeti 1, lokacija Travnik 2 ustreza Mofeti 2 in lokacija Travnik 3 ustreza Mofeti 3, vse iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Polna linija prikazuje vzorčenje v letu 2010, prekinjena linija pa vzorčenje v letu 2011. Različne barve krivulj prikazujejo različne mesece vzorčenja, modra za aprilsko, zelena za junijsko, rdeča za avgustovsko in rumena za oktobrsko vzorčenje. MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 97 % podobnosti.

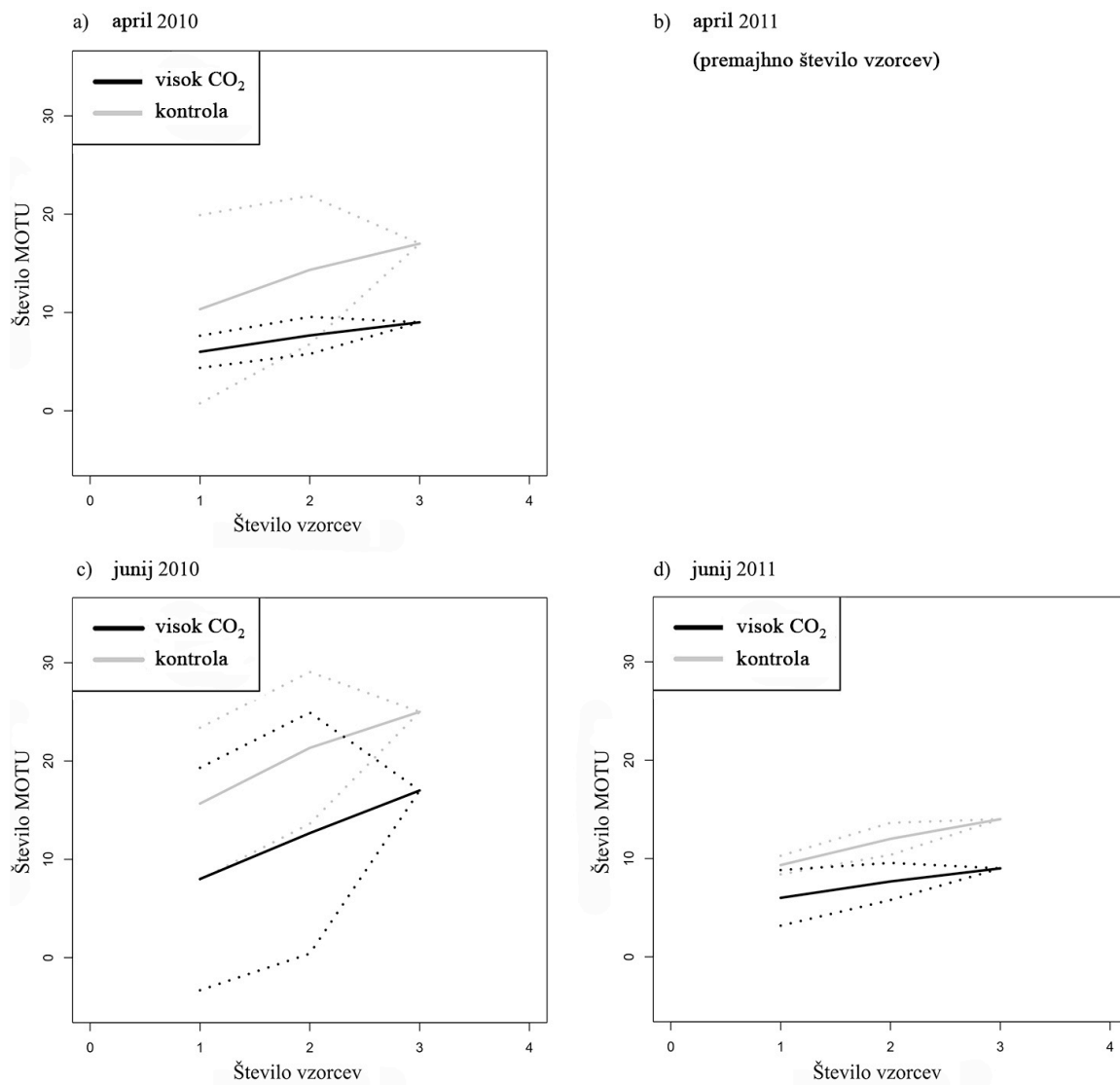
Figure 16. MOTU rarefaction curves (number of MOTU based on the number of analysed sequences) of each sample from meadow mofette, location of sampling is shown next to the corresponding curve. Location Travnik 1 corresponds to Mofette 1, location Travnik 2 corresponds to Mofette 2, location Travnik 3 corresponds to Mofette 3, all sampled within meadow mofette near Stavešinci. Full line corresponds to 2010 samples, broken line to 2011 samples, with different colour of curves for each month sampled, blue for April, green for June, red for August and yellow for October sampling. MOTU represent sequences clustered at 97 % sequence similarity.

Skupno število vseh MOTU, ki smo jih zabeležili tekom vzorčenja, smo prikazali s krivuljami kopičenja vrst (slika 16). Krivulje kopičenja vrst, izračunane ločeno za vsak mesec (slika 16), prikazujejo povprečne vrednosti posameznih krivulj (\pm interval zaupanja) skupaj za vse tri vzorčene lokacije ter skupaj za vzorčenje v obeh letih. Krivulje kopičenja vrst so se približale asimptoti v mesecu avgustu in v oktobru in so imele tudi manjši interval zaupanja v primerjavi z aprilskim in junijskim vzorčenjem, kjer se krivulje niso približale asimptoti. Manjše intervale zaupanja lahko prav tako opazimo pri krivuljah kopičenja vrst za podatke iz vzorčenja v letu 2011, v primerjavi z vzorčenjem v letu 2010 (slika 17).



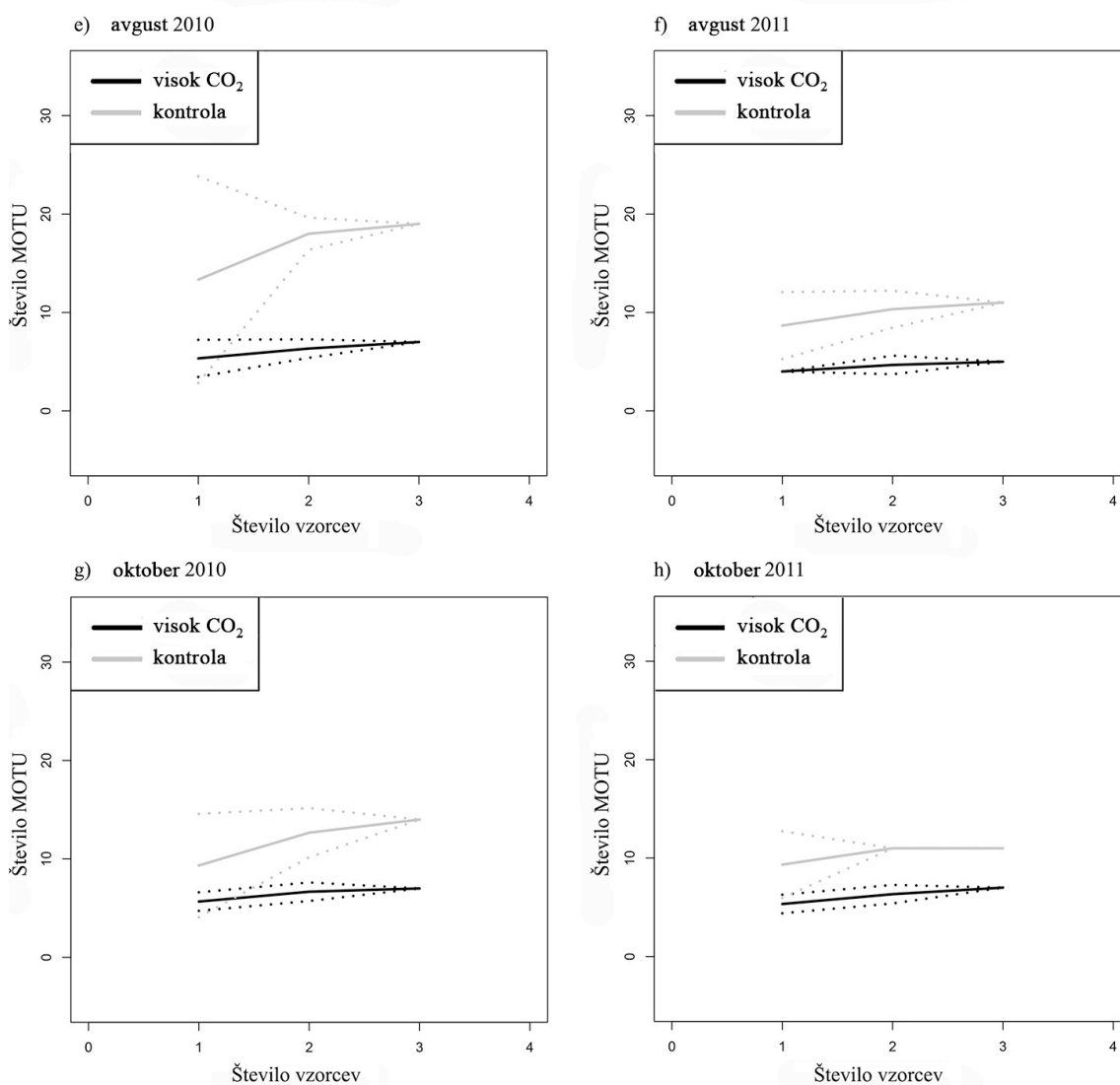
Slika 17. Krivulje kopičenja MOTU (število molekularskih operativnih taksonomskih enot – MOTU v odvisnosti od števila vzorcev) prikazujejo povprečne vrednosti števila MOTU (\pm interval zaupanja) vseh treh vzorčenih lokacij ter vzorčenj v obeh letih, prikazane ločeno za vsak mesec. Polne linije prikazujejo krivulje kopičenja, prekinjene linije prikazujejo intervale zaupanja. Črna barva krivulj označuje območje z visoko koncentracijo CO₂, siva barva krivulj označuje kontrolno območje. MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 97 % podobnosti.

Figure 17. MOTU accumulation curves (number of molecular operational taxonomic unit – MOTU based on the number of analysed sequences) are showing the average number of MOTU (\pm confidence interval) of all three sampled locations and for both years of sampling, separated by month of sampling. Full line of the accumulation curves and broken line for the confidence intervals. Black colour of curves indicates high CO₂ samples and grey colour indicates control samples. MOTU represent sequences clustered at 97 % sequence similarity.



se nadaljuje

nadaljevanje



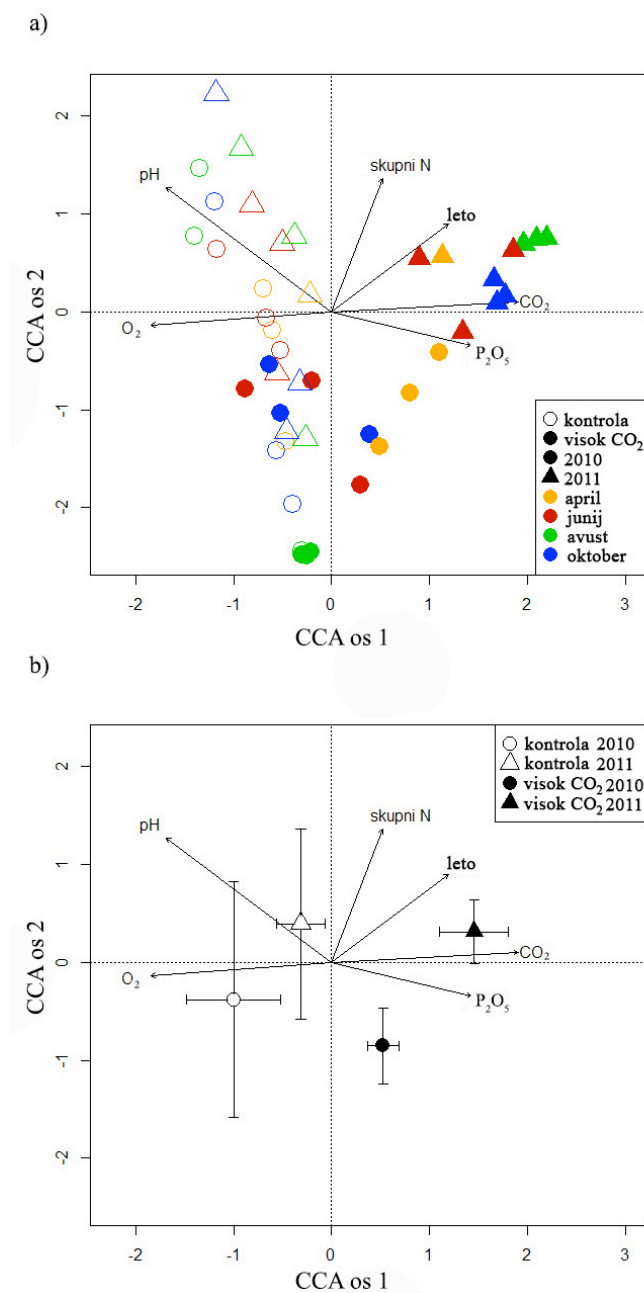
Slika 18. Krivulje kopičenja MOTU (število molekularnih operativnih taksonomskih enot – MOTU v odvisnosti od števila vzorcev) prikazujejo povprečne vrednosti števila MOTU (\pm interval zaupanja) vseh treh vzorčenih lokacij, prikazane ločeno za vsak mesec in ločeno za obe leti vzorčenja. Polne linije prikazujejo krivulje kopičenja, prekinjene linije prikazujejo intervale zaupanja. Črna barva krivulj označuje območje z visoko koncentracijo CO₂, siva barva krivulj označuje kontrolno območje. MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 97 % podobnosti.

Figure 18. MOTU accumulation curves (number of molecular operational taxonomic units – MOTU based on the number of analysed sequences) are showing the average number of MOTU (\pm confidence interval) of all three sampled locations, separated by month and by year sampled. Full line shows accumulation curves and broken line is indicating the confidence intervals. Black colour of curve corresponds to high CO₂ samples and grey colour indicated control samples. MOTU represent sequences clustered at 97 % sequence similarity.

4.2.2.2 Sestava združb AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev

Vpliv abiotičnih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv smo na območju travniških mofet v okolici Stavešincev ovrednotili s kanonično korespondenčno analizo (CCA). 68,29 % variabilnosti znotraj združb AM gliv je pojasnjeno s prvima dvema osema ordinacije CCA. Abiotični dejavniki okolja, ki so bili zajeti v analizo CCA, so talne lastnosti (pH, skupni dušik, razpoložljivi fosfor), vremenski podatki (minimalna temperatura, maksimalna temperatura, količina padavin, dolžina sončnega obsevanja), leto in mesec vzorčenja ter koncentracija CO₂ in koncentracija O₂ v tleh. Za določitev okoljskih dejavnikov, ki statistično značilno vplivajo na sestavo združb AM gliv, smo uporabili permutacijski test (10.000 ponovitev) okoljskih vektorjev za CCA ($P < 0,005$ pri reduciranem modelu). Združbe AM gliv iz območja travniških mofet se grupirajo v dve gruči (ANOVA; $P < 0,001$) na prvi osi CCA, in tako predstavljajo združbo AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in združbo AM gliv s kontrolnih območij (CCA; slika 18). Na ordinaciji CCA (slika 18) so prikazani izključno tisti okoljski vektorji, ki statistično značilno vplivajo na sestavo združb ($P < 0,05$), tj. koncentracija CO₂ in O₂ v tleh, pH, razpoložljivi fosfor, skupni dušik in vpliv leta vzorčenja ($P < 0,001$ v vseh naštetih primerih). Opazimo lahko tudi, da sta koncentraciji CO₂ in O₂ močno povezani s prvo osjo CCA, ki pojasni 46,19 % variabilnosti znotraj združb AM gliv, saj z njo skoraj sovpadata.

Edini okoljski dejavnik, ki značilno vpliva na sestavo združb in ni vezan na lastnosti tal, je vzorčenje v različnih letih ($R^2 = 0,48$).

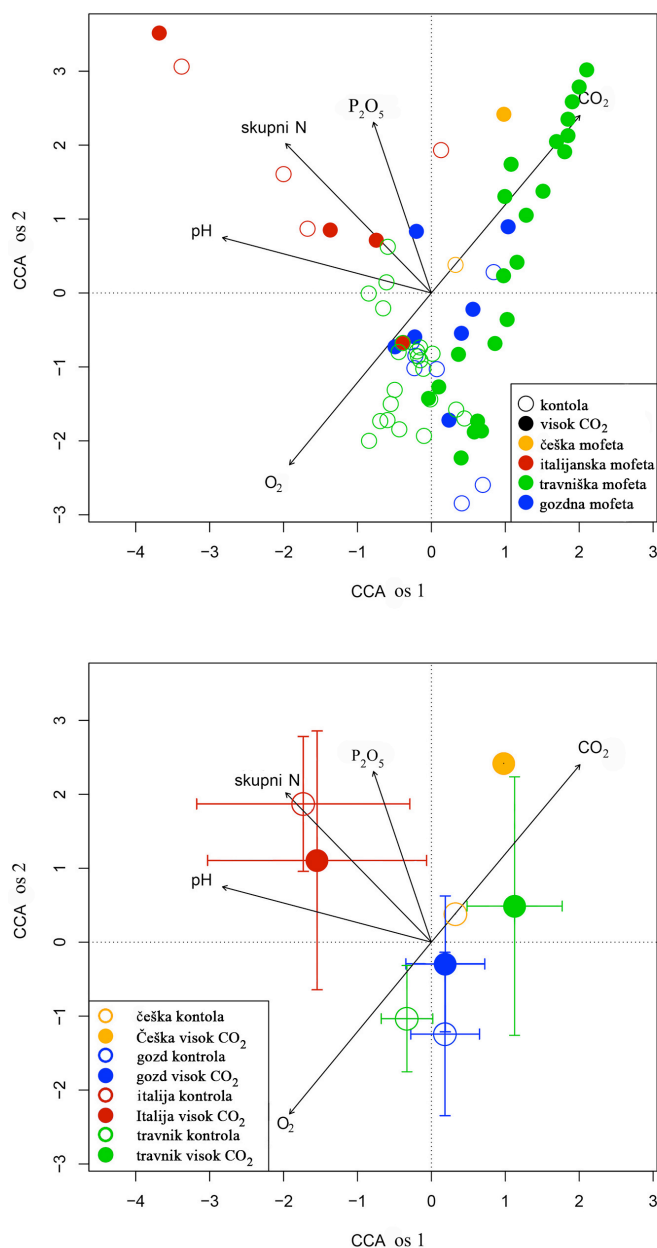


Slika 19. Ordinacija CCA (kanonična korespondenčna analiza) združb AM gliv iz območja travniških mofet, kjer CCA os 1 pojasni 46,19 % variabilnosti znotraj združb AM gliv, in CCA os 2 pojasni 22,10 % variabilnosti. Na grafu (a) točke predstavljajo združbo AM gliv na posamezni lokaciji vzorčenja, na grafu (b) so vzorci združeni po mesecih in so prikazana povprečja ± standardni odklon vrednosti osi CCA. Statistično značilni ($P < 0,05$) okoljski vektorji so prikazani na ordinaciji CCA s puščicami.

Figure 19. AM fungal community CCA (constrained correspondence analysis) plot for meadow mofette. The CCA axis one explained 46.19 % of AM fungal variability in AM fungal community composition, and CCA axis two 22.10 % of variability. In plot (a) all sampled community of AM fungi from meadow locations are plotted separately, whereas in plot (b) samples are pooled by month, and points are representing average ± standard deviation of CCA scores. Significant ($P < 0.05$) environmental vectors are presented on CCA plot.

4.2.2.3 Sestava združb AM gliv na mofetah na večji prostorski skali

Vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv smo preučevali tudi na večji prostorski skali štirih geografsko oddaljenih mofet (travniške mofete in gozdne mofete v Stavešincih, italijanske mofete in češke mofete; glej poglavje 3.2 za opis lokacij). 84,39 % variabilnosti znotraj geografsko oddaljenih združb AM gliv na različnih mofetah je pojasnjeno s prvima dvema osema ordinacije CCA (kanonična korespondenčna analiza). Abiotski dejavniki okolja, ki so bili zajeti v analizo CCA, so: talni parametri (pH, skupni dušik, razpoložljivi fosfor), datum vzorčenja ter koncentracija CO₂ in O₂ v tleh (glej poglavje 4.1.1). Za določitev okoljskih dejavnikov, ki statistično značilno vplivajo na sestavo združb AM gliv, smo uporabili permutacijski test (10.000 ponovitev) okoljskih vektorjev za CCA ($P < 0,005$ pri reduciranem modelu). Na ordinaciji CCA (slika 19) so prikazani okoljski vektorji, ki statistično značilno vplivajo na sestavo združb AM gliv na vseh obravnavanih mofetah. To so: koncentracija CO₂ in O₂, pH, razpoložljivi fosfor in skupni dušik ($P < 0,05$ v vseh naštetih primerih). Z ordinacijsko analizo (slika 19) nismo opazili vidnih vzorcev biogeografije AM gliv med različnimi mofetami, najverjetneje zaradi precejšnje variabilnosti v talnih parametrih med različnimi lokacijami (preglednica 7, preglednica 10, preglednica 11), manjše koncentracije CO₂ na območju visokega CO₂ pri italijanski mofeti (preglednica 12) in drugih, neznanih dejavnikih, ki jih nismo zajeli v našo študijo. Bolj jasno sliko podajo povprečni vzorci (tj. povprečje vrednosti CCA osi vzorcev iz različnih mofet; slika 19), prikazani ločeno za območja z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolna območja za vsako izmed mofet. Iz slike 19 je razvidno, da se združbe AM gliv s kontrolnih območij, ločenih za vsako mofeto, razlikujejo od združb z območij z visoko koncentracijo CO₂ v smeri okoljskega vektorja CO₂/O₂, kar sicer ne velja za italijansko mofeto. Pri italijanski mofeti se kaže močnejši vpliv talnih dejavnikov (razpoložljivi fosfor, skupni dušik in pH). Podrobnejša analiza okoljskih vektorjev nam pokaže, da kljub razliki v talnih parametrih največ variabilnosti znotraj geografsko oddaljenih združb AM gliv pojasni koncentracija CO₂ ($R^2 = 0,98$), sledi koncentracija O₂ ($R^2 = 0,91$) in pH ($R^2 = 0,86$). Iz tega lahko povzamemo, da je dolgotrajna izpostavitve povečani koncentraciji CO₂ tista, ki pojasni največ variabilnosti znotraj sestave združb AM gliv, vzorčenih na štirih geografsko oddaljenih mofetah, ki se razlikujejo tako po združbi rastlin kot tudi po talnih dejavnikih.



Slika 20. Ordinacija CCA (kanonična korespondenčna analiza) združb AM gliv iz območja štirih mofet (travniških mofet, gozdnih mofet, italijanskih mofet in čeških mofet), kjer CCA os 1 pojasni 58,44 % variabilnosti znotraj združb AM gliv in CCA os 2 pojasni 25,95 % variabilnosti. Na sliki (a) točke predstavljajo združbe AM gliv na različnih lokacijah in ob različnih terminih vzorčenja, na sliki (b) so točke združene po mofetah in so prikazana povprečja ± standardni odklon vrednosti osi CCA. Statistično značilni ($P < 0,05$) okoljski vektorji so prikazani na ordinaciji CCA s puščicami.

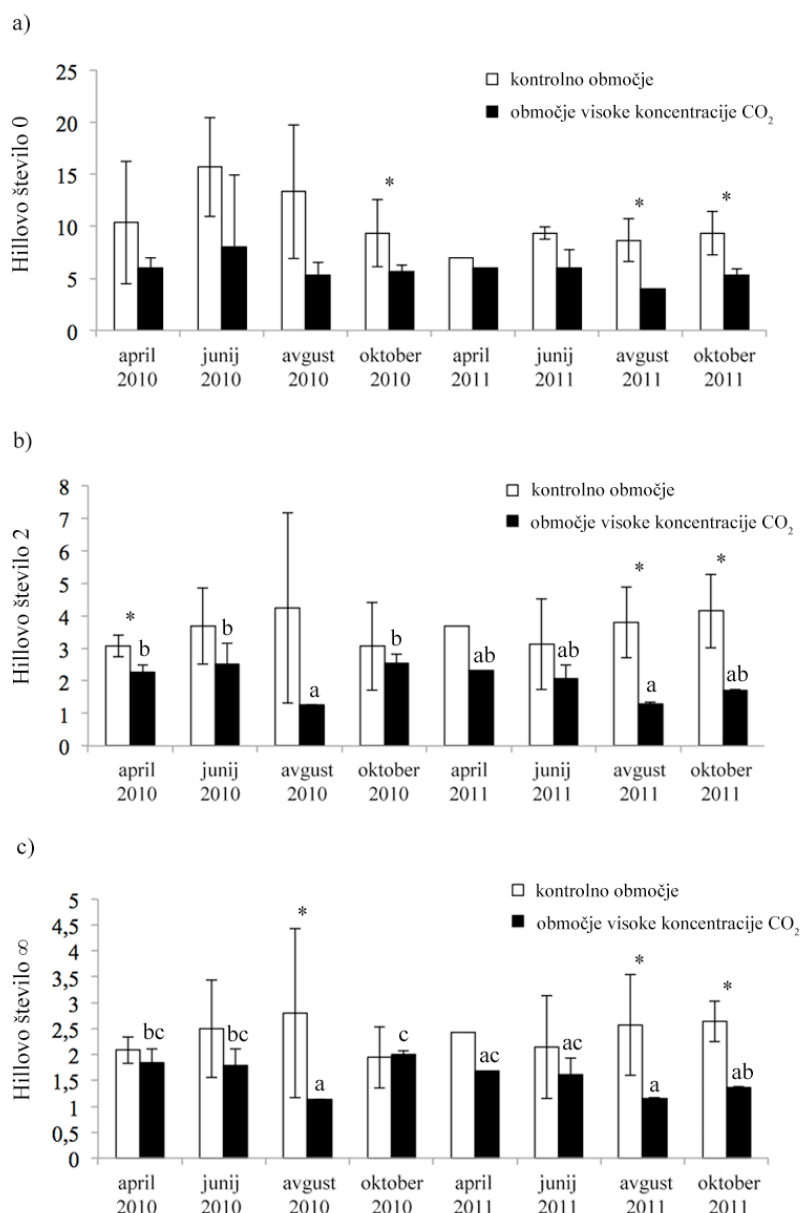
Figure 20. AM fungal community CCA (constrained correspondence analysis) plot for mofette sites in four different locations (meadow mofettes, forest mofettes, Italian mofettes and Czech mofettes). The CCA axis one explained 58.44 % of variability in AM fungal community composition and CCA axis two 25.95 % of variability. In plot (a) community of AM fungi from different mofettes are ploed separately, whereas in plot (b) samples are pooled by mofette, and are representing average ± standard deviation of CCA scores. Only significant ($P < 0.05$) environmental vectors are presented on CCA plot.

4.2.2.4 Diverziteti AM gliv na območjih mofet

Diverziteti AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev smo ovrednotili s Hillovimi števili 0, 2 in ∞ (slika 20), kjer Hillovo število 0 predstavlja pestrost MOTU, Hillovo število 2 izenačenost MOTU (inverzni Simpsonov indeks) in Hillovo število ∞ dominantno MOTU (inverzni Berger-Parkerjev indeks). Opazili smo statistično značilno razliko med diverziteti AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnih območij pri vseh treh analiziranih Hillovih številih (ANOVA s koncentracijo CO₂, mesecem in letom kot faktorjem; $P < 0,001$). Dodatno smo pri Hillovem številu 0 opazili, da se je diverziteti AM gliv v koreninah rastlin, vzorčenih leta 2010, statistično značilno razlikovala od diverziteti AM gliv v koreninah, vzorčenih leta 2011 ($P < 0,04$). Statistično značilnih razlik med različnimi meseci vzorčenja ni bilo.

Združbe AM gliv, vzorčene s kontrolnih območij, imajo večjo pestrost MOTU (izračunano s Hillovim številom 0), večjo izenačenost MOTU (izračunano s Hillovim številom 2) in večjo dominantno MOTU (izračunano s Hillovim številom ∞) v primerjavi s tistimi združbami, ki so bile vzorčene z območij z visoko koncentracijo CO₂ (slika 20). Podrobnejša analiza podatkov o sestavi združb AM gliv, ki izvirajo iz območij z visoko koncentracijo CO₂, je pokazala statistično značilne razlike v diverziteti AM gliv, izračunani s Hillovima številoma 2 in ∞ med različnimi datumi vzorčenja. Tega pa nismo opazili pri diverziteti AM gliv, izračunani s Hillovim številom 0, med različnimi datumi vzorčenja AM gliv iz kontrolnih območij (slika 20). Najbolj opazne so bile razlike med diverziteti AM gliv iz območij z visoko koncentracijo CO₂ v primerjavi z diverziteti AM gliv iz kontrolnih območij, tako pri Hillovem številu 2 kot ∞ , za meseca avgust 2010 in avgust 2011 ter oktober 2010 in oktober 2011. Tu smo opazili tudi najmanjšo diverziteti AM gliv iz območij z visoko koncentracijo CO₂ in največjo diverziteti AM gliv iz kontrolnih območij.

Analiza beta diverziteti, ki nam pove razliko v vrstni sestavi med različnimi lokacijami vzorčenja, je pokazala značilno razliko med sestavo združb AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji (PERMANOVA, izračunana na podlagi 10.000 permutacij; $P < 0,001$), kar skupaj z ordinacijo CCA in Hillovimi števili potrjuje statistično značilno razliko v sestavi združb AM gliv med območji z različnim režimom CO₂.



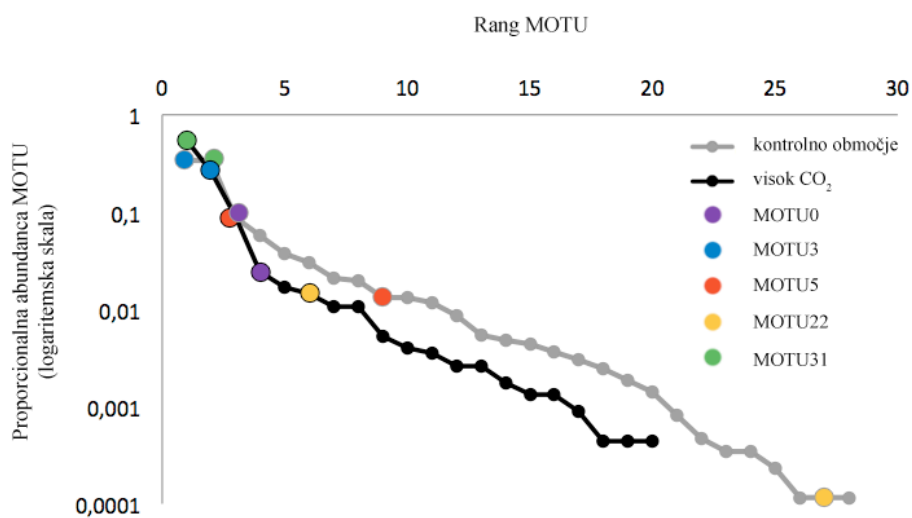
Slika 21. Diverziteteta AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, izražena s Hillovim številom 0 (pestrost vrst), Hillovim številom 2 (izenačenost vrst) in Hillovim številom ∞ (dominanca vrst). Statistično značilne razlike med diverziteteto AM gliv, na lokacijah z visoko koncentracijo CO₂ in diverziteteto AM gliv na kontrolnih lokacijah (znotraj enega meseca), so prikazane z * ($P < 0,05$; Kruskal-Wallisov test). Statistično značilne razlike (ANOVA, test mnogoterih primerjav – Tukey) v diverziteteti AM gliv med različnimi meseci vzorčenja znotraj kontrolnih območij ali območij z visoko koncentracijo CO₂, so prikazane z različno črko (a, b, c, d).

Figure 21. Diversity of AM fungi in the meadow mofettes near Stavešinci as shown by the Hill's number 0 (sample richness), Hill's number 2 (species evenness), and Hill's number ∞ (species dominance). Significant differences in diversity between AM fungal community sampled from high and control CO₂ sites within a month are indicated with * ($P < 0.05$; Kruskal-Wallis rank sum test). Significant differences in diversity of AM fungal community (ANOVA, post hoc Tukey contrasts) among different months and within high CO₂ or control locations are indicated with different letters (a, b, c, d).

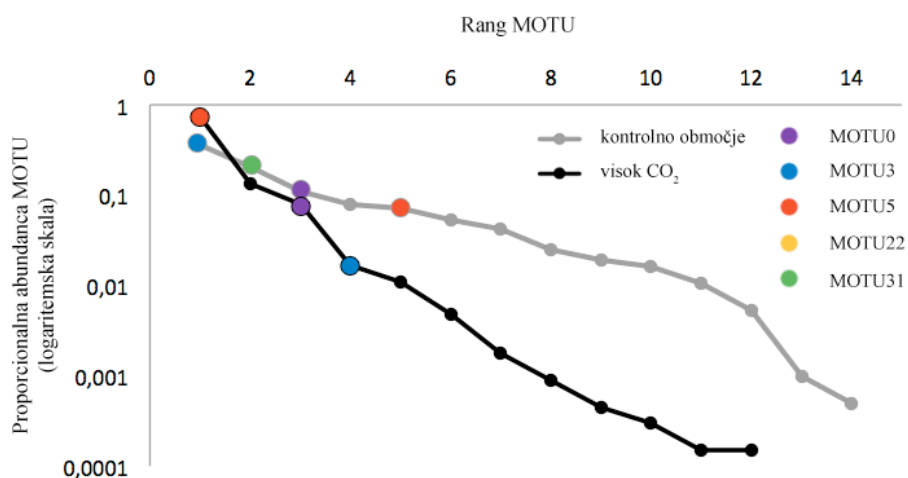
4.2.2.5 Kvantifikacijski parametri v sestavi združb AM gliv na območjih mofet

Večjo diverziteto AM gliv, v vzorcih korenin rastlin s kontrolnih območij v primerjavi z diverziteto AM gliv, v koreninah rastlin z območij z visoko koncentracijo CO₂, prikazujejo tudi grafi porazdelitve proporcionalne abundance posameznih MOTU AM gliv (slika 21). Rangi MOTU so razvrščeni na način, da rang 1 pripada MOTU, ki je najbolj abundanten, rang 2 pripada MOTU, ki je drugi najbolj abundanten in tako dalje. Opazimo lahko večjo izenačenost MOTU, ki je prikazana s počasnejšim padanjem krivulje, in večjo pestrost, ki je prikazana z večjim številom rangov MOTU, v združbi AM gliv, vzorčenih s kontrolnih območij, v primerjavi s tistimi z območij z visoko koncentracijo CO₂ (slika 21). Razlika je še bolj očitna pri združbah AM gliv, vzorčenih v letu 2011, kot pri tistih iz leta 2010. Razlog za razliko med obema letoma bi lahko bil tudi v statistično značilni razliki med številom analiziranih sekvenc v letu 2010 med območji z visoko koncentracijo CO₂, in kontrolnimi območji (2.275 sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ in 8.641 sekvenc s kontrolnih območij), medtem ko v letu 2011 statističnih razlik ni bilo (6.417 sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ in 8.055 sekvenc s kontrolnih območij). Na sliki 20 so dodatno označeni najbolj abundantni MOTU s kontrolnih območij (MOTU3, MOTU31, MOTU0) in najbolj abundantni MOTU z območij z visoko koncentracijo CO₂ (MOTU5 in MOTU22) (slika 21, slika 22), da lahko primerjamo njihovo pojavljanje glede na rang pojavljanja tako v združbi AM gliv z območij visoke koncentracije CO₂ kot tudi v združbi AM gliv s kontrolnih območij. Dodatno lahko primerjamo prisotnost najbolj abundantnih MOTU tudi med letom 2010 in letom 2011. Opazimo lahko, da so MOTU0, MOTU3 in MOTU5 prisotni v združbi AM gliv tako z območij z visoko koncentracijo CO₂ kot s kontrolnih območij ter da so bili prisotni v obeh letih vzorčenja. To kaže na njihovo konsistentno pojavljanje na tem območju, kar je lahko posledica močnega vpliva abiotskih dejavnikov okolja in s tem povezanih selekcijskih pritiskov na talne organizme. Takson MOTU31, ki je drugi najbolj abundanten MOTU s kontrolnih območij, je bil v obeh letih prisoten na kontrolnih območjih, medtem ko smo ga na območjih z visoko koncentracijo zasledili samo v letu 2010. V letu 2010 se je MOTU22, drugi najbolj abundanten MOTU z območij z visoko koncentracijo CO₂, pojavil tako na območjih z visoko koncentracijo CO₂ kot tudi na kontrolnih območjih, vendar ga v letu 2011 na območju travniških mofet nismo zasledili.

a) vzorčenje v letu 2010



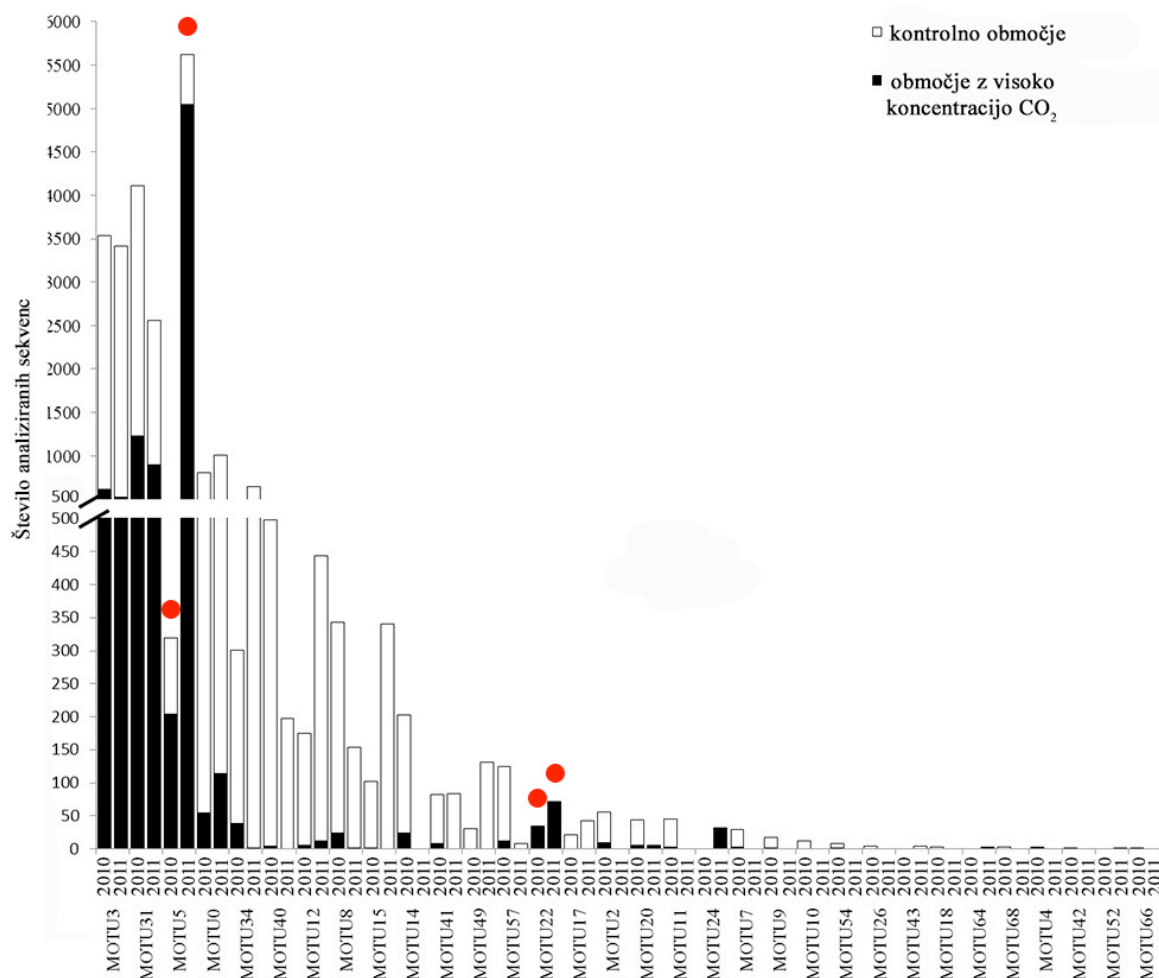
a) vzorčenje v letu 2011



Slika 22. Porazdelitev proporcionalne abundance MOTU iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Porazdelitev je prikazana kot proporcionalna abundanca MOTU v odvisnosti od abundance rangov MOTU na logaritemski skali. Siva barva krivulj označuje združbo AM gliv s kontrolnih območij, črna barva označuje združbo AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂. Različne barve krogov označujejo različne MOTU.

Figure 22. MOTU proportional abundance distribution of the AM fungal community recorded at meadow mofette near Stavešinci. MOTU proportional abundance distributions are displayed as rank-abundance plots with relative abundance plotted on log-scale. Grey colour indicates AM fungal community from control CO₂ locations, black colour indicates AM fungal community from high CO₂ exposed locations. Colour of different circles corresponds to different MOTU.

Na sliki 22 je prikazana porazdelitev abundance MOTU, ločeno za leto 2010 in leto 2011, za lažjo interpretacijo sprememb v sestavi združb AM gliv med posameznimi leti. Na sliki smo z rdečo piko označili dva MOTU, ki sta najbolj podobna filotipoma Glo85 in Glo86 iz objave Maček in sod. (2011), to sta MOTU5 in MOTU22 (slika 22).



Slika 23. Porazdelitev abundance molekularnih operativnih taksonomskih enot – MOTU iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev. Porazdelitev MOTU je prikazana kot abundanca rangov, kjer je abundanca MOTU predstavljena za leto 2010 in leto 2011. Bela barva stolpcev predstavlja sekvence AM gliv iz kontrolnih območij, črna barva stolpcev predstavlja sekvence AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂. Z rdečimi pikami smo označili MOTU5 in MOTU22, ki sta najbolj podobna filotipoma Glo85 in Glo86 iz objave Maček in sod. (2011).

Figure 23. Molecular operational taxonomic unit - MOTU abundance distribution of the AM fungal community recorded at meadow mofettes near Stavešinci. MOTU abundance distribution is displayed as rank-abundance plot, with abundance in 2010 and 2011 plotted separately. White colour of bars represents AM fungal sequences from control CO₂ locations, black colour of bars represents AM fungal sequences from high CO₂ exposed locations. Red dots are indicating MOTU5 and MOTU22, the most similar to Glo85 and Glo85 from Maček et al. (2011).

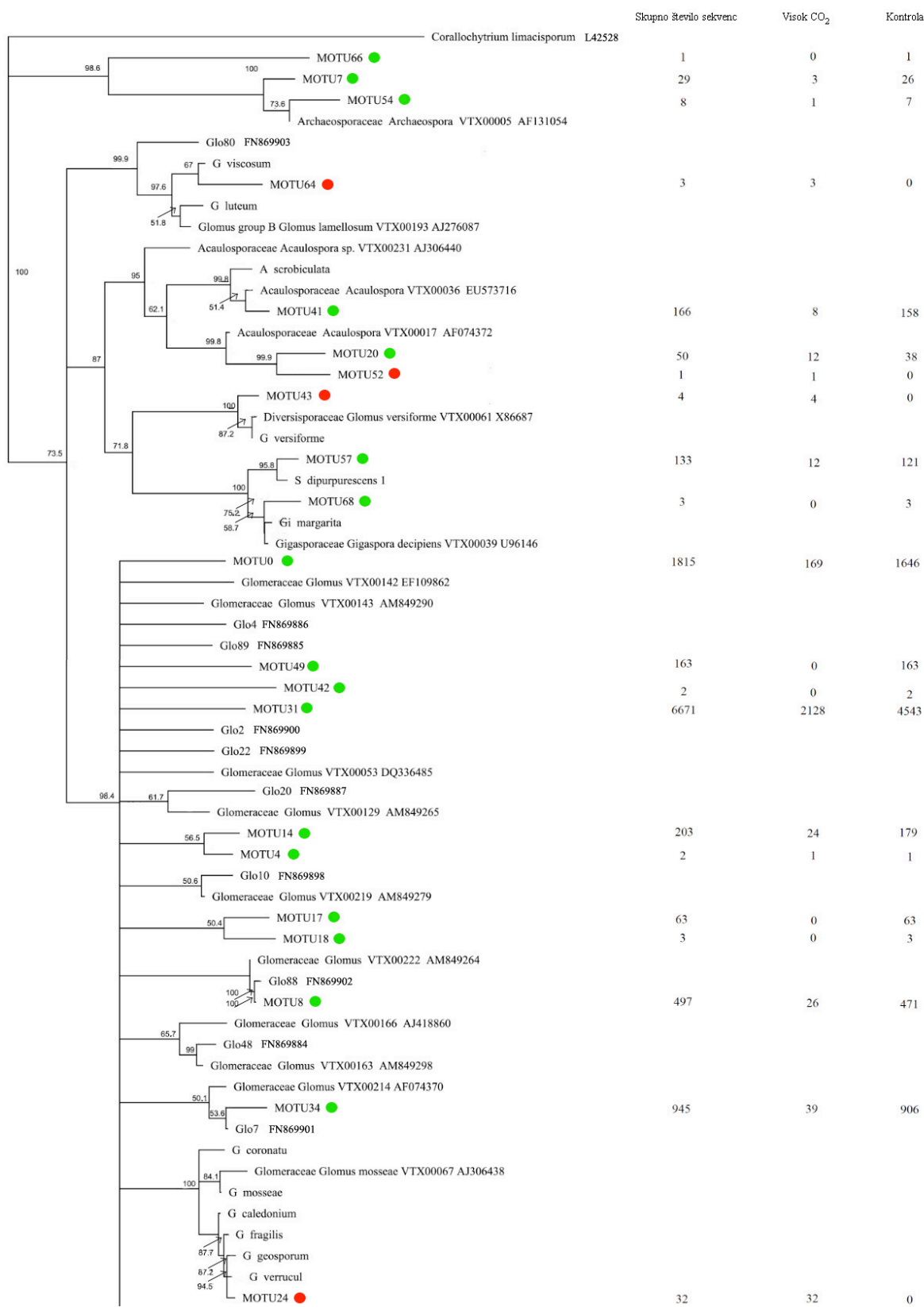
4.2.2.6 Filogenetska sestava združb AM gliv na območju travniških mofet

Na območju travniških mofet v okolici Stavešincev smo analizirali 25.685 sekvenc AM gliv, ki pripadajo 32 MOTU. Glede na podatkovno bazo MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>; Öpik in sod., 2010) smo z uporabo iskalnega algoritma BLAST razvrstili analizirane sekvence v 6 skupin AM gliv: *Archaeosporaceae*, *Glomus* skupina B, *Acaulosporaceae*, *Diversisporaceae*, *Gigasporaceae* in *Glomeraceae* (preglednica 16, slika 23). Največ sekvenc (25.287) pripada družini *Glomeraceae*, kjer je 8.949 sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ in 16.338 sekvenc s kontrolnih območij. Samo znotraj skupin *Glomus* B in *Diversisporaceae* je bilo več sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ kot s kontrolnih območij, vendar so številke premajhne, da bi lahko iz tega potegnili kakšne zaključke (preglednica 16, slika 23).

Preglednica 16. Sekvence AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnih območij, glede na bazo MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>).

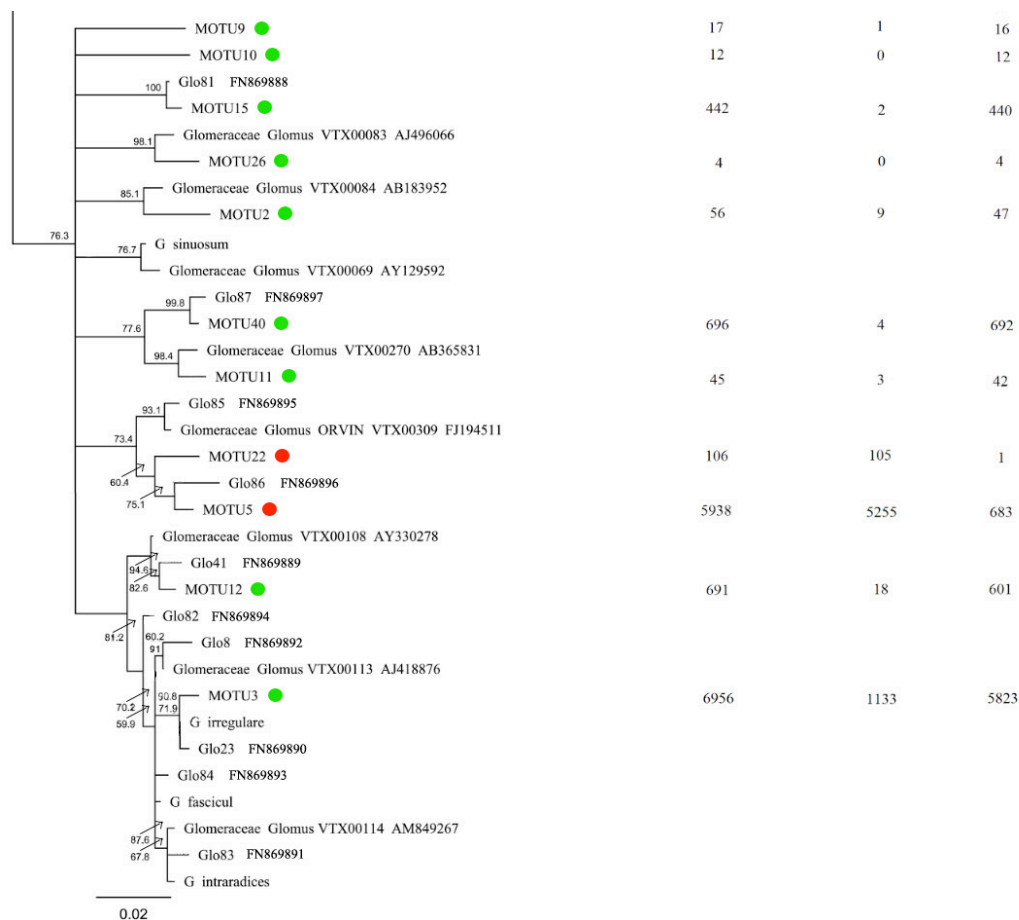
Table 16. AM fungal sequences from high CO₂ exposed locations and control locations, classified using MaarjAM database (<http://maarjam.botany.ut.ee>).

Skupina	Št. MOTU	Število sekvenc iz območja		
		Visok CO ₂	Kontrola	Skupaj
<i>Archaeosporaceae</i>	3	4	34	28
<i>Glomus</i> skupina B	1	3	0	3
<i>Acaulosporaceae</i>	3	21	196	217
<i>Diversisporaceae</i>	1	4	0	4
<i>Gigasporaceae</i>	2	12	124	136
<i>Glomeraceae</i>	22	8.949	16.338	25.287
Skupaj	32	8.993	16.692	25.685



se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 24. Filogenetsko drevo MOTU AM gliv iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev ter njihovih filogenetsko najbližjih sorodnikov (baza MaarjAM; Öpik in sod., 2010). Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distančne metode združevanja najbližjega soseda (»neighbor joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap«) s 1000 permutacijami. Zeleni krogi predstavljajo MOTU, kjer je večina sekvenc s kontrolnih območij, rdeči krogi predstavljajo MOTU, kjer je večina sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂.

Figure 24. Neighbor-joining phylogeny of AM fungi MOTU recorded at Stavešinci meadow mofette and their closest phylogenetic relatives (MaarjAM database; Öpik et al., 2010). Bootstrap values (1000 replicates) are shown above the branches and before the node to which they correspond. Green circles are representing MOTU with the highest abundance of sequences from control locations, and red circles are representing MOTU with the highest abundance of sequences from high CO₂ locations.

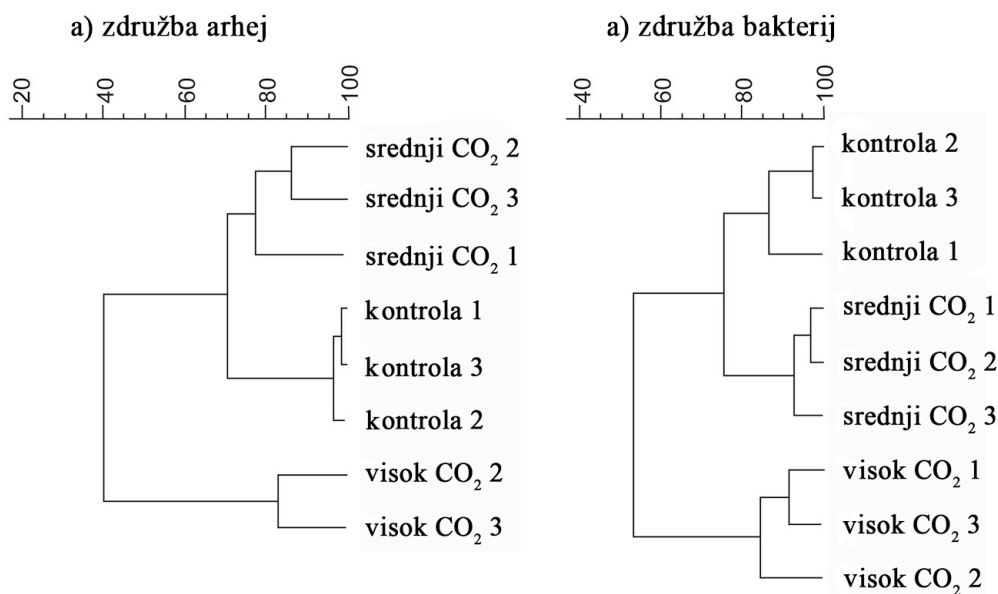
4.3 RAZISKAVE SESTAVE ZDRUŽB IN DIVERZITETE ARHEJ IN BAKTERIJ NA OBMOČJIH MOFET

Za analizo sestave združb in biodiverzitete arhej in bakterij smo vzorčili tla na območju travniških mofet v okolici Stavešincev z območij z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnih območij. Iz tal smo izolirali DNK arhej in bakterij. Z namenom, da bi ugotovili, ali se združbe arhej in bakterij razlikujejo med območji z različno koncentracijo CO₂, smo najprej z metodo dolžinskega polimorfizma terminalnih restriksijskih fragmentov T-RFLP določili razlike v združbi arhej in bakterij med območji z različno koncentracijo CO₂. Na podlagi ugotovljenih razlik smo izvedli natančnejšo analizo sestave mikrobnih združb v tleh s knjižnico klonov 16S rRNA prisotnih arhej in bakterij.

Rezultati tega segmenta doktorata so objavljeni tudi v članku avtorjev N. Šibanc, A. J. Dumbrell, I. Mandić - Mulec in I. Maček z naslovom »Impacts of naturally elevated soil CO₂ concentrations on communities of soil archaea and bacteria« v reviji *Soil Biology & Biochemistry*, 68: 348–365 (2014).

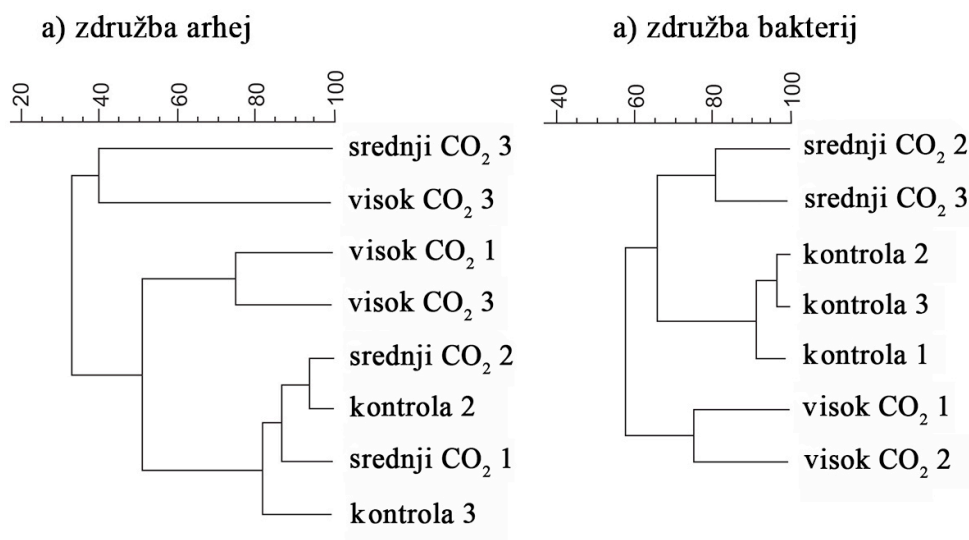
4.3.1 Profili mikrobnih združb

Za začetno analizo razlik v sestavi združb arhej ter združb bakterij med lokacijami z različnim plinskim režimom z vsaj 48 % CO₂ (85,5 ± 21,7 % CO₂, **visok CO₂**), od 11 do 20 % CO₂ (13,8 ± 3,2 % CO₂, **srednji CO₂**) in z manj kot 0,2 % CO₂ v talnem zraku (0,2 ± 0,0 % CO₂, **kontrola**), smo na območju travniških mofet v okolici Stavešincev uporabili metodo dolžinskega polimorfizma terminalnih restriksijskih fragmentov T-RFLP (slika 24 in slika 25). Iz talnih vzorcev smo izolirali DNK ter pomnožili DNK arhej in bakterij z označenimi začetnimi oligonukleotidi. Očiščene produkte PCR smo razrezali z encimoma HaeIII (slika 24) in HhaI (slika 25). Rezultati so pokazali jasno ločevanje med združbami arhej in bakterij glede na lokacije vzorčenja in posledično razlike v izpostavljenosti geološkemu CO₂. Rezultati dodatno kažejo podobnost v sestavi združb z območij s srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji. Tu se združbe tako bakterij kot arhej močno razlikujejo od združb na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Na podlagi ugotovljenih razlik smo izvedli natančnejšo analizo sestave mikrobnih združb v tleh z metodo kloniranja, ki ji je sledilo sekvenciranje po Sangerju.



Slika 25. Profili T-RFLP mikrobnih zdržb, vzorčenih iz tal z območij z visoko koncentracijo CO₂ (visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (srednji CO₂) in kontrolnih območij (kontrola). Produkte PCR smo razrezali z encimom HaeIII. a) zdržba arhej in b) zdržba bakterij. Podatki so bili analizirani s programom Bionumeric 3.0. Vrednosti predstavljajo % podobnosti med profili vzorcev na podlagi Pearsonovih korelacij in klasterkega algoritma UPGMA.

Figure 25. Microbial community T-RFLP profiles from the high CO₂ exposed soils (high), medium CO₂ exposed soils (medium) and control soils (control). PCR products were digested using HaeIII enzyme. a) archaeal community and b) bacterial community. Data were analysed with Bionumeric 3.0 software. Dendrogram represents % similarities between profiles of the samples, based on Pearson correlations with the UPGMA clustering algorithm.



Slika 26. Profili T-RFLP mikrobnih združb, vzorčenih iz tal območij z visoko koncentracijo CO₂ (visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (srednji CO₂) in kontrolnih območij (kontrola). Produkte PCR smo razrezali z encimom HhaI. a) združba arhej in b) združba bakterij. Podatki so bili analizirani s programom Bionumeric 3.0. Vrednosti predstavljajo % podobnosti med profili vzorcev na podlagi Pearsonovih korelacij in klusterskega algoritma UPGMA.

Figure 26. Microbial community T-RFLP profiles from the high CO₂ exposed soils (high), medium CO₂ exposed soils (medium) and control soils (control). PCR products were digested using HhaI enzyme. a) archaeal community and b) bacterial community. Data were analysed with Bionumeric 3.0 software. Dendrogram represents similarities between profiles of the samples, based on Pearson correlations with the UPGMA clustering algorithm.

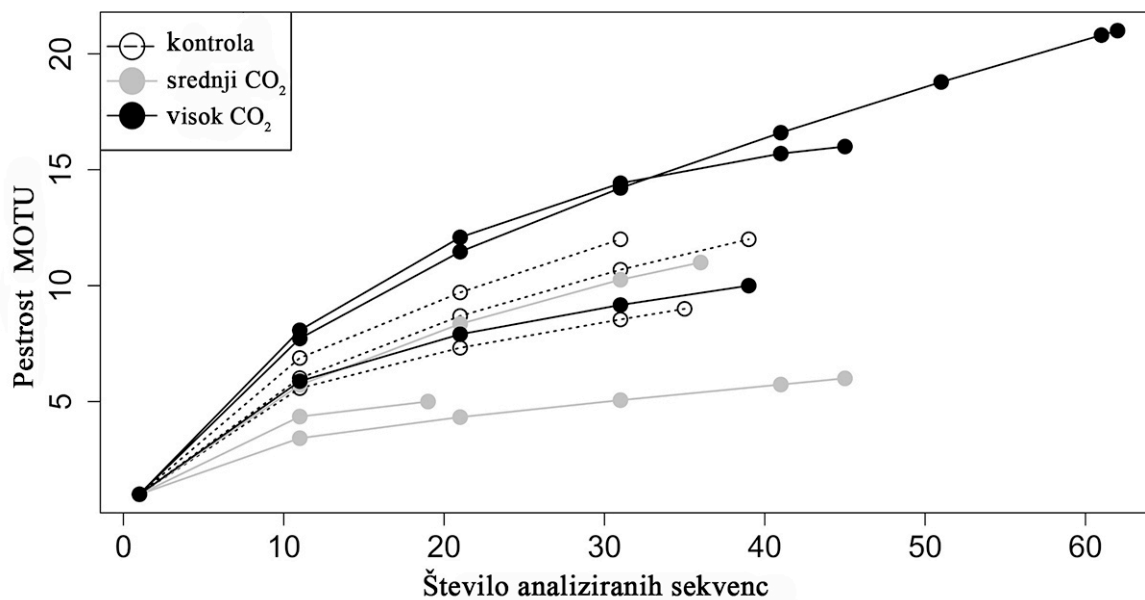
4.3.2 Genska klonska knjižnica 16S rRNK

Sekvence 499 klonov bakterij smo grupirali v 259 bakterijskih molekularnih operativnih taksonomskih enot (MOTU) in sekvence 351 klonov arhej grupirali v 47 arhejskih MOTU z uporabo programa QIIME (Caporaso in sod., 2010). V skupnem številu sekvenc klonov med območji z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji nismo opazili statistično značilnih razlik (Kruskal-Wallisov test; arheje $\chi^2 = 3,41$, s.p. = 2, $P = 0,18$; bakterije $\chi^2 = 2,53$, s.p. = 2, $P = 0,28$).

4.3.2.1 Krivulje redčenja vrst

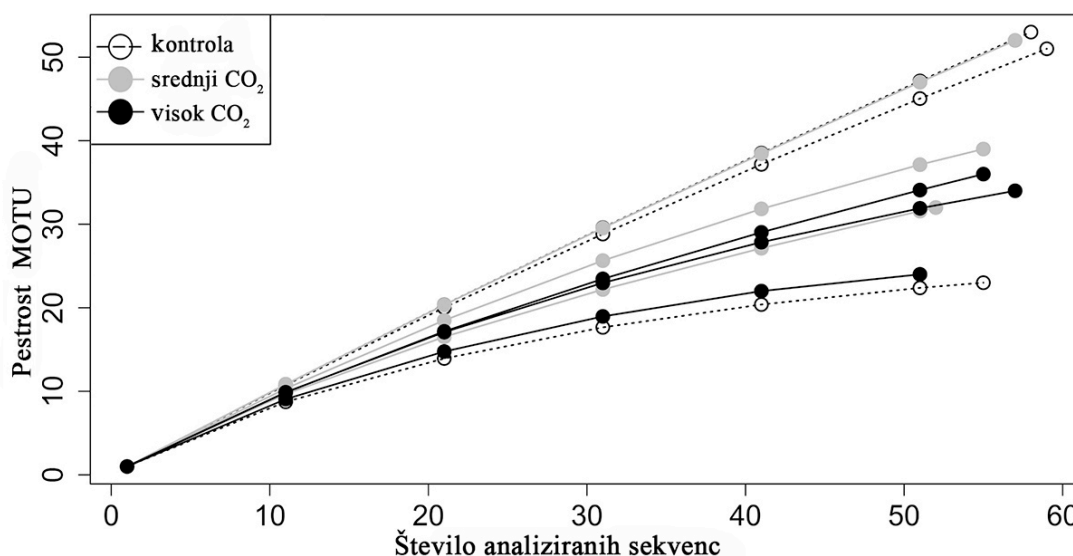
Pri združbah bakterij smo ugotovili bolj strme krivulje redčenja MOTU v primerjavi z združbami arhej. V nobenem primeru pa se krivulje niso približale asimptoti (slika 26 za arheje in slika 27 za bakterije). Pri bakterijah smo opazili manjše število različnih MOTU v vzorcih tal z območij z visoko koncentracijo CO₂ v primerjavi s kontrolnimi območji,

medtem ko je bilo število različnih MOTU pri arhejah večje na kontrolnih območjih v primerjavi z območji z visoko koncentracijo CO₂.



Slika 27. Krivulje redčenja MOTU arhej iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (črna barva; visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (siva barva; srednji CO₂) in kontrolno območje (bela barva; kontrola). MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 95 % podobnosti.

Figure 27. Rarefactions curve for archaeal MOTU from the high CO₂ exposed soils (black colour; high CO₂), medium CO₂ exposed soils (grey colour; medium CO₂) and control soils (white colour; control). MOTU represent sequences clustered at 95 % sequence similarity.



Slika 28. Krivulje redčenja molekularskih operativnih taksonomskih enot – MOTU bakterij iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (črna barva; visok CO₂), srednjo koncentracijo CO₂ (siva barva; srednji CO₂) in kontrolno območje (bela barva; kontrola). MOTU predstavljajo sekvence grupirane na podlagi 95 % podobnosti.

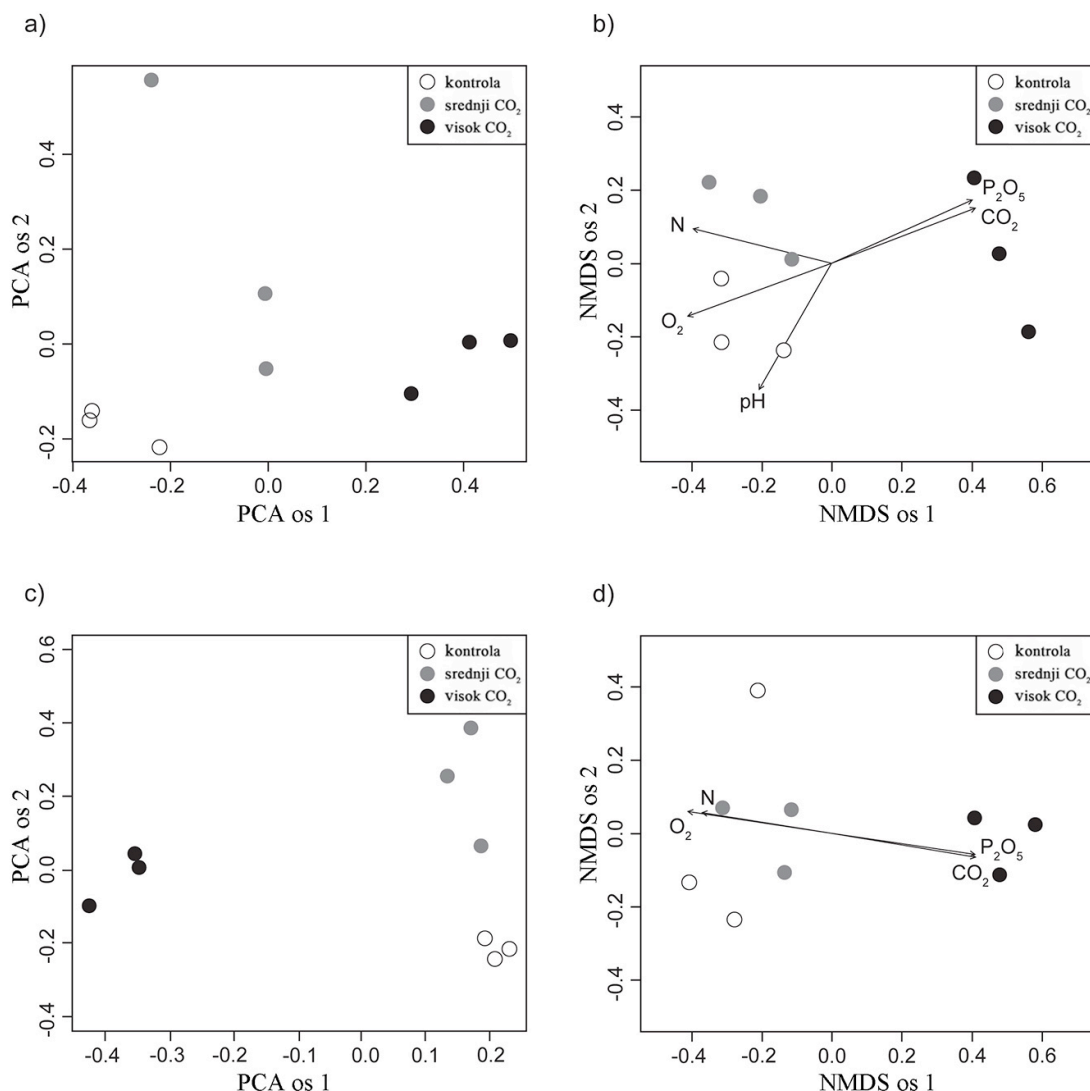
Figure 28. Rarefactions curve for bacterial molecular operational taxonomic units - MOTU from the high CO₂ exposed soils (black colour; high CO₂), medium CO₂ exposed soils (grey colour; medium CO₂) and control soils (white colour; control). MOTU represent sequences clustered at 95 % sequence similarity.

4.3.2.2 Ordinacijski prikaz razlik v sestavi združb arhej in bakterij

Razlike v sestavi združb arhej in bakterij smo analizirali na podlagi filogenetske matrike UniFrac in Jaccardovega indeksa različnosti (slika 28). Statistično značilno grupiranje MOTU (permutacijski test UniFrac, na podlagi 100 permutacij; $P < 0,01$) med območji z visoko, srednjo ali kontrolno koncentracijo CO₂ smo opazili na ordinacijskem grafu analize glavnih komponent (PCA), ki smo ga izdelali na podlagi matrike filogenetskih razdalj UniFrac z uporabo spletne aplikacije UniFrac (Lozupone in sod., 2006). Prva os PCA je pojasnila 36 % in 27 %, druga os PCA je pojasnila 18 % in 15 % variabilnosti v združbi arhej in bakterij. Prva os PCA je ločila vzorce z območij z visoko koncentracijo CO₂ od ostalih območij, medtem ko je druga os PCA ločila območja s srednjo koncentracijo CO₂ od kontrolnih območij.

Statistično značilne razlike v sestavi združb arhej in bakterij med vzorci z območij z visoko koncentracijo CO₂ in ostalimi območji (srednja koncentracija CO₂ in kontrola) lahko opazimo tudi pri ordinacijskem grafu nemetričnega večrazsežnostnega lestvičenja (NMDS), ki smo ga izdelali na podlagi Jaccardovega indeksa (PERMANOVA z 10.000 permutacijami; $P < 0,01$). Opazili smo statistično značilno korelacijo med sestavo združb arhej oz. bakterij in koncentracijo CO₂ v tleh ($P < 0,01$; $R^2 > 0,957$) ter s P₂O₅ ($P < 0,01$;

R² > 0,953), O₂ ($P < 0,01$; R² > 0,962), N ($P < 0,05$; R² > 0,790) in v primeru arhej tudi s pH ($P < 0,05$; R² > 0,583), kot je razvidno iz ordinacije NMDS (slika 28).

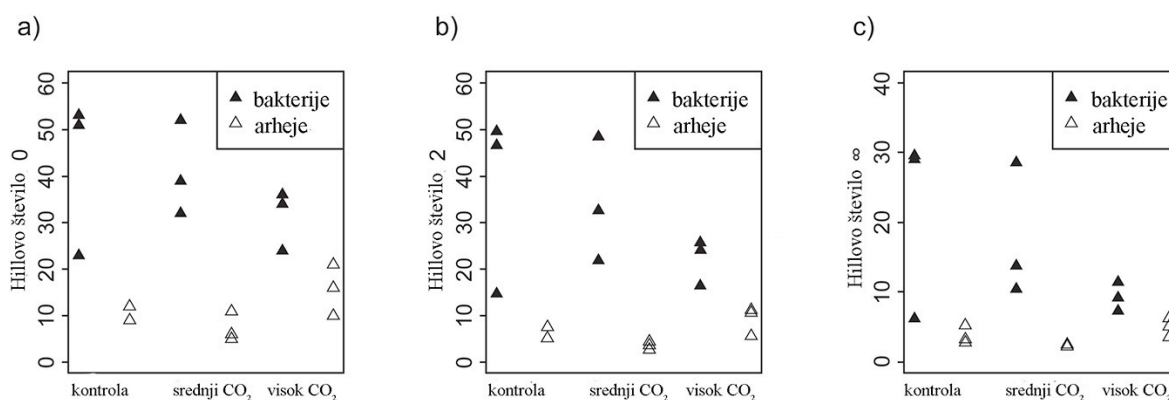


Slika 29. Ordinacijski graf mikrobnih združb, kjer (a, b) prikazuje združbo arhej in (c, d) združbo bakterij. Grafa temeljita na filogenetski razdalji UniFrac, prikazani z ordinacijo PCA (a, c) in na Jaccardovem indeksu, prikazanem z ordinacijo NMDS (b, d). Prikazani so vzorci iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (črni simboli), srednjo koncentracijo CO₂ (sivi simboli) in kontrolo (beli simboli). Statistično značilni okoljski vektorji so prikazani na ordinaciji NMDS (b, d) in predstavljajo koncentracijo CO₂ in O₂, pH, skupni N in dostopni P₂O₅. Največ variabilnosti znotraj združb tako arhej kot bakterij je bilo pojasnjene s koncentracijo O₂ (R² > 0,962 v obeh primerih).

Figure 29. Microbial community ordination plots for archaea (a, b) and bacteria (c, d). Plots are based on both UniFrac phylogenetic distances with PCA ordination (a, c) and Jaccard's distance with NMDS ordination (b, d). Samples from high CO₂ (black symbols), medium CO₂ (grey symbols) and control CO₂ exposed soils (open symbols) are shown. Significant environmental vectors are presented on NMDS plots (b, d), which include soil CO₂ and O₂ concentration, pH, N, and available P₂O₅. O₂ concentration was consistently the best predictor of archaeal and bacterial community composition (R² > 0.962 in both cases).

4.3.2.3 Diverzitetni indeksi

Med območji z visoko in srednjo koncentracijo CO₂ ter kontrolnim območjem ni bilo razlik v diverziteti združb arhej in bakterij, določenih s Hillovimi števili (slika 29) (Kruskal-Wallisov test; $P > 0,05$ za združbe arhej in bakterij). Edina izjema je diverzitetna arhej, izračunana s Hillovim številom 2 ($P = 0,04$), ki ga lahko interpretiramo kot ekvivalent Simpsonovemu indeksu, torej merilu za izenačenost združb. Diverzitetna bakterij (določena s Hillovimi števili 0, 2 in ∞) ni bila statistično značilno povezana s koncentracijo CO₂ v tleh (Pearsonova korelacija; $r = -0,49$, $P = 0,18$ za Hillovo število 0; $r = -0,53$, $P = 0,14$ za Hillovo število 2; $r = -0,44$, $P = 0,23$ za Hillovo število ∞). Prav tako tudi diverzitetna arhej (določena s Hillovimi števili 0, 2 in ∞) ni bila statistično značilno povezana s koncentracijo CO₂ v tleh ($r = 0,64$, $P = 0,06$ za Hillovo število 0; $r = 0,55$, $P = 0,12$ za Hillovo število 2; $r = 0,57$, $P = 0,11$ za Hillovo število ∞).



Slika 30. Diverzitetna mikrobna združba z območij z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnega območja za bakterije (polni trikotniki) in arheje (prazni trikotniki). Prikazana so Hillova števila 0 (a; pestrost združb), 2 (b; izenačenost združb) in ∞ (c; dominanca združb).

Figure 30. Microbial diversity from high CO₂, medium CO₂ and control CO₂ exposed soils, for bacteria (full triangle) and archaea (empty triangle). Hill's number 0 (a; species richness), 2 (b; species evenness) and ∞ (c; species dominance) are presented.

4.3.2.4 Filogenetska sestava združb arhej in bakterij

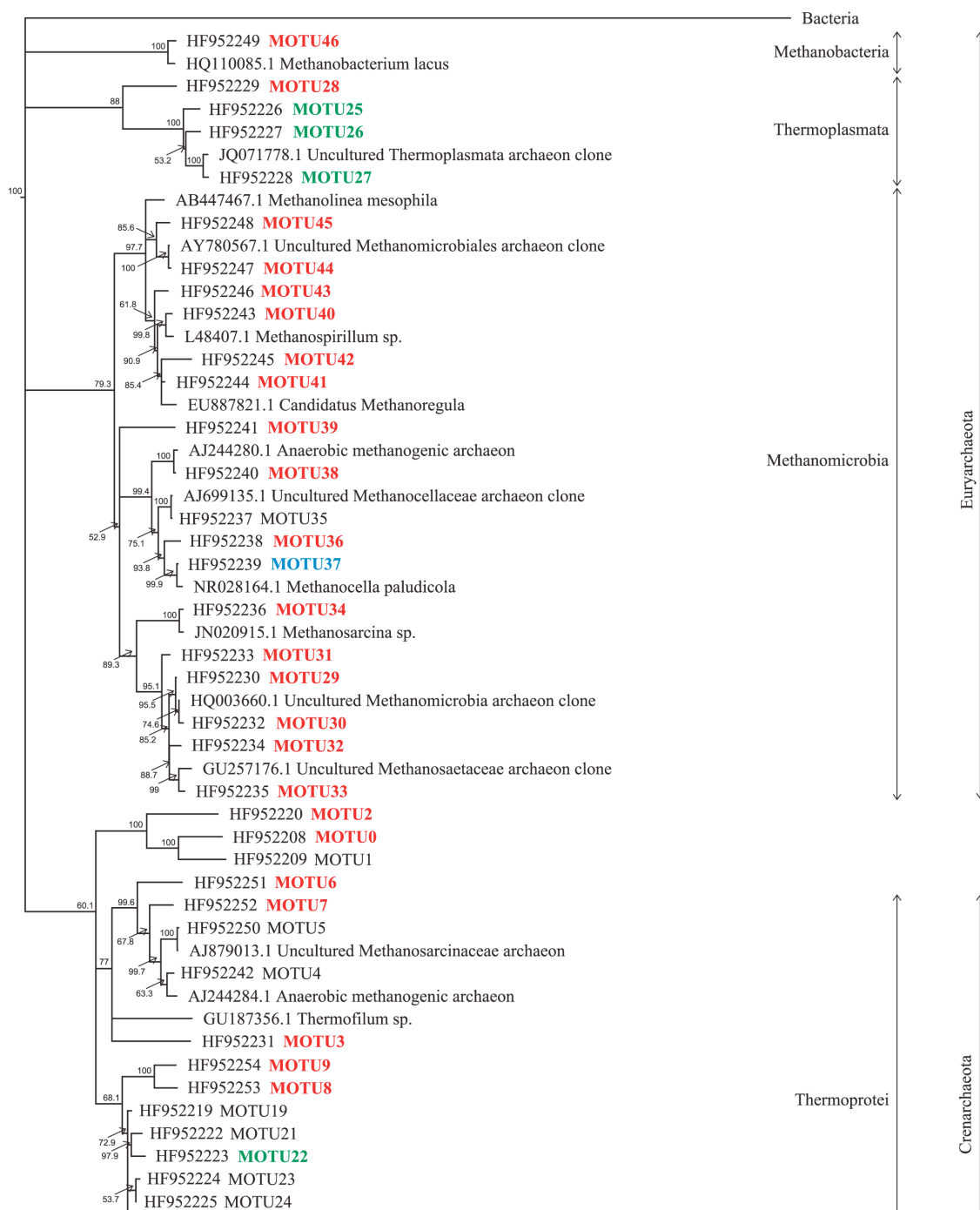
Večina sekvenc iz klonske knjižnice **arhej** (69 %) se najbolj ujema z razredom *Thermoprotei* (deblo *Crenarchaeota*), ne glede na to, ali so vzorci izhajali iz območja z visoko, s srednjo ali kontrolno koncentracijo CO₂ (preglednica 17 in slika 30). Sekvence iz razreda *Thermoprotei* so prevladovali v vzorcih iz območja s srednjo koncentracijo CO₂ (94 %) in kontrolnega območja (95 %). Medtem ko je bil razred *Methanomicrobia* (deblo *Euryarchaeota*) edini, katerega sekvence so bile statistično značilno pogostejše v vzorcih

iz območja z visoko koncentracijo CO₂ (58 %), kar kaže, da so organizmi, ki pripadajo temu razredu, prilagojeni na visoke koncentracije CO₂ v tleh in na hipoksijo. Sekvence razreda *Thermoplasmata* so bile statistično značilno številčnejše na kontrolnem območju. Klasificirali smo pet sekvenc iz debla *Thaumarchaeota* (štiri na območju z visoko koncentracijo CO₂ in eno na območju s srednjo koncentracijo CO₂), ki so bile več kot 95 % podobne izolatu *Nitrosotalea devanaterre* (Lehtovirta - Morley in sod., 2011). Na območju z visoko koncentracijo CO₂ smo odkrili le eno sekvenco razreda *Methanobacteria*, medtem ko 3 % sekvenc arhej nismo mogli uvrstiti v nobenega od poznanih debel (tj. 8 klonov iz območja z visoko koncentracijo CO₂ in en klon iz območja s srednjo koncentracijo CO₂).

Preglednica 17. Sekvence 16S rRNK arhej iz območja z visoko in srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnega območja. Statistično značilna razlika v relativni abundanci taksonov je označena odebeljeno ($P < 0,05$). Nadpisane črke označujejo rezultate testov Tukeyevih kontrastov.

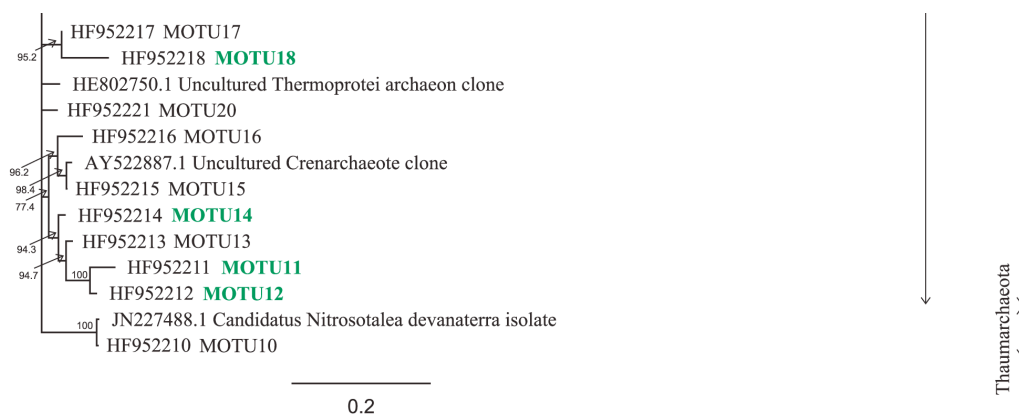
Table 17. Archaeal 16S rRNA sequences from high, medium or control CO₂ exposed soils. The relative abundance of taxa highlighted in bold is significantly ($P < 0.05$) different across sites. Letters indicate results of Tukey's contrasts post-hoc tests.

Deblo	Razred	Povprečno število sekvenc (\pm SD)			Skupaj
		Visok CO ₂	Srednji CO ₂	Kontrola	
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermoprotei</i>	15,7 \pm 3,2 ^a	32,0 \pm 12,1 ^a	33,3 \pm 4,5 ^a	243
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteria</i>	0,3 \pm 0,6 ^a	0 ^a	0 ^a	1
	<i>Methanomicrobia</i>	28,3 \pm 10,4 ^a	0,7 \pm 0,6 ^b	0 ^b	87
	<i>Thermoplasmata</i>	0,3 \pm 0,6 ^a	0 ^a	1,7 \pm 0,6 ^b	6
<i>Thaumarchaeota</i>		1,3 \pm 2,3 ^a	0,3 \pm 0,6 ^a	0 ^a	5
Neklasificirani		2,7 \pm 2,5 ^a	0,3 \pm 0,6 ^a	0 ^a	9



se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 31. Filogenija MOTU arhej, vzorčenih na travniški mofeti v okolici Stavešincev. Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distantne metode združevanja najbližjega soseda (»neighbor joining«). MOTU v rdeči barvi so bili prisotni samo v vzorcih iz območja z visoko koncentracijo CO₂, MOTU, označeni z modro barvo, so bili prisotni samo na območju s srednjo koncentracijo CO₂, MOTU v zeleni barvi so bili prisotni samo na kontrolnem območju. MOTU v črni barvi niso lokacijsko specifični. MOTU, ki jih nismo uspeli klasificirati v deblo ali razred (z uporabo baze RDP – The Ribosomal Database Project), so prikazani s prekinjeno vertikalno črto na desni strani drevesa. Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap values«) s 1000 permutacijami.

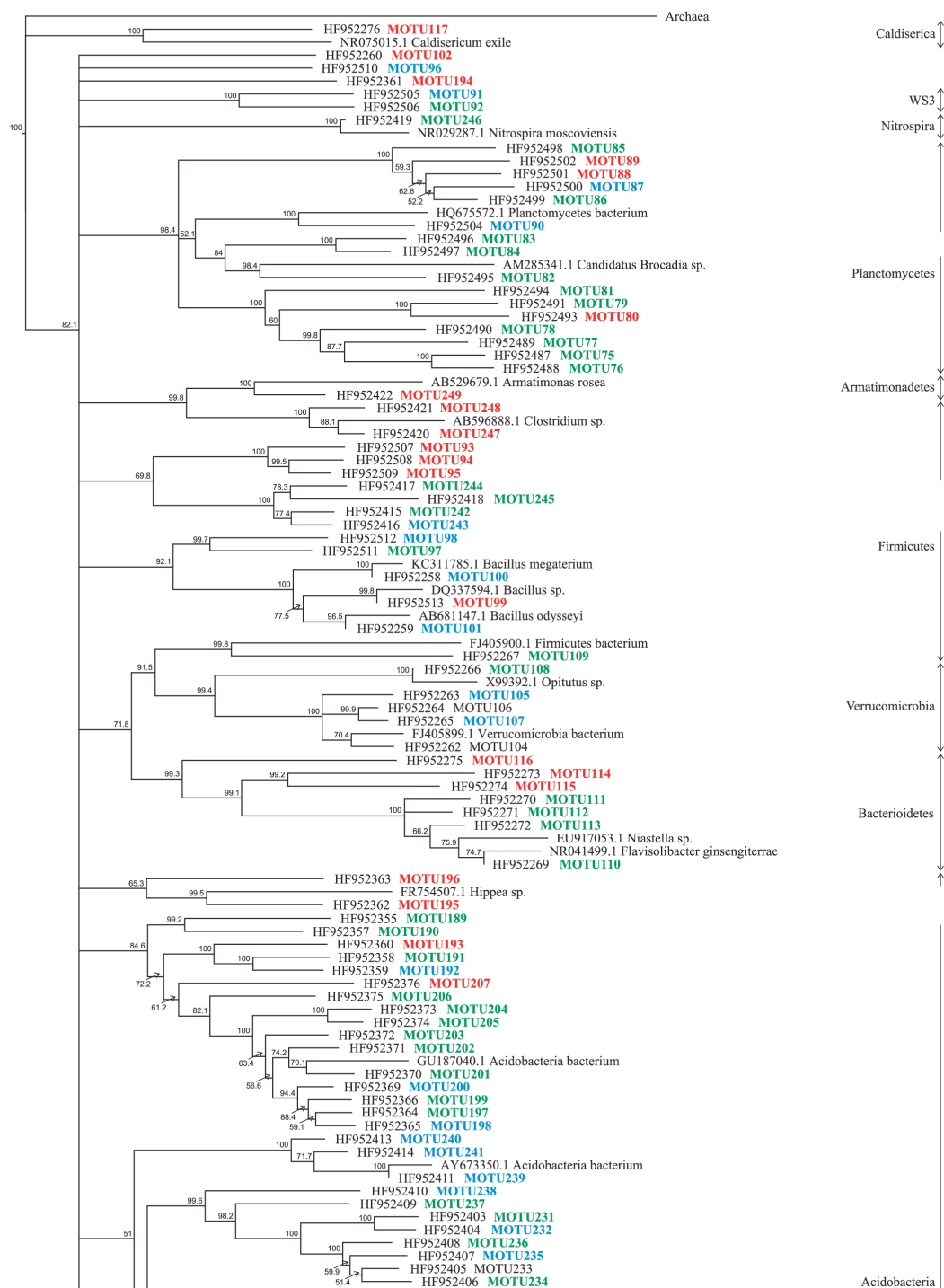
Figure 31. Neighbor-joining phylogeny of archaeal MOTUs recorded at Stavešinci mofette. MOTUs highlighted in red colour were only recorded in the high CO₂ exposed soil, MOTUs highlighted in blue colour were only recorded in medium CO₂ exposed soil and MOTUs highlighted in green colour were only recorded in control soils. MOTUs in black colour are not location (CO₂ exposition) specific. RDP – The Ribosomal Database Project unclassified MOTUs are marked with a brake in the line on the right side of the figure. Bootstrap values (1000 replicates) are shown above the branches and before the node to which they correspond.

Sekvence klonske knjižnice **bakterij** so bile v primerjavi s sekvencami klonske knjižnice arhej klasificirane v večje število različnih debel (preglednica 18 in slika 31). Sekvence so bile porazdeljene med debli *Proteobacteria* (28 %), *Acidobacteria* (23 %), *Actinobacteria* (13 %), *Chloroflexi* (9 %), *Verrucomicrobia* (6%), *Firmicutes* (3 %), *Bacteroidetes* (2 %), *Planctomycetes* (2 %), *Gemmatimonadetes* (1 %), *Caldiserica* (1 %) ter *Armatimonadetes*, *Nitrospira* in WS3 (po en klon iz vsakega). 11 % sekvenc je ostalo nevrščenih, in sicer 20 klonov z območja z visoko koncentracijo CO₂, 14 klonov z območja s srednjo koncentracijo CO₂ ter 20 klonov s kontrolnega območja. Sekvence v deblih *Chloroflexi* in *Firmicutes* so bile statistično značilno številčnejše na območju visoke koncentracije CO₂, v primerjavi s kontrolnim območjem, medtem ko so bile sekvence v razredu *Deltaproteobacteria* najštevilčnejše na kontrolnem območju.

Preglednica 18. Sekvence 16S rRNK bakterij z območij z visoko in srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnega območja. Statistično značilna razlika v relativni abundanci taksonov je prikazana z odebeljenim besedilom ($P < 0,05$). Nadpisane črke označujejo rezultate testa mnogoterih primerjav (Tukey).

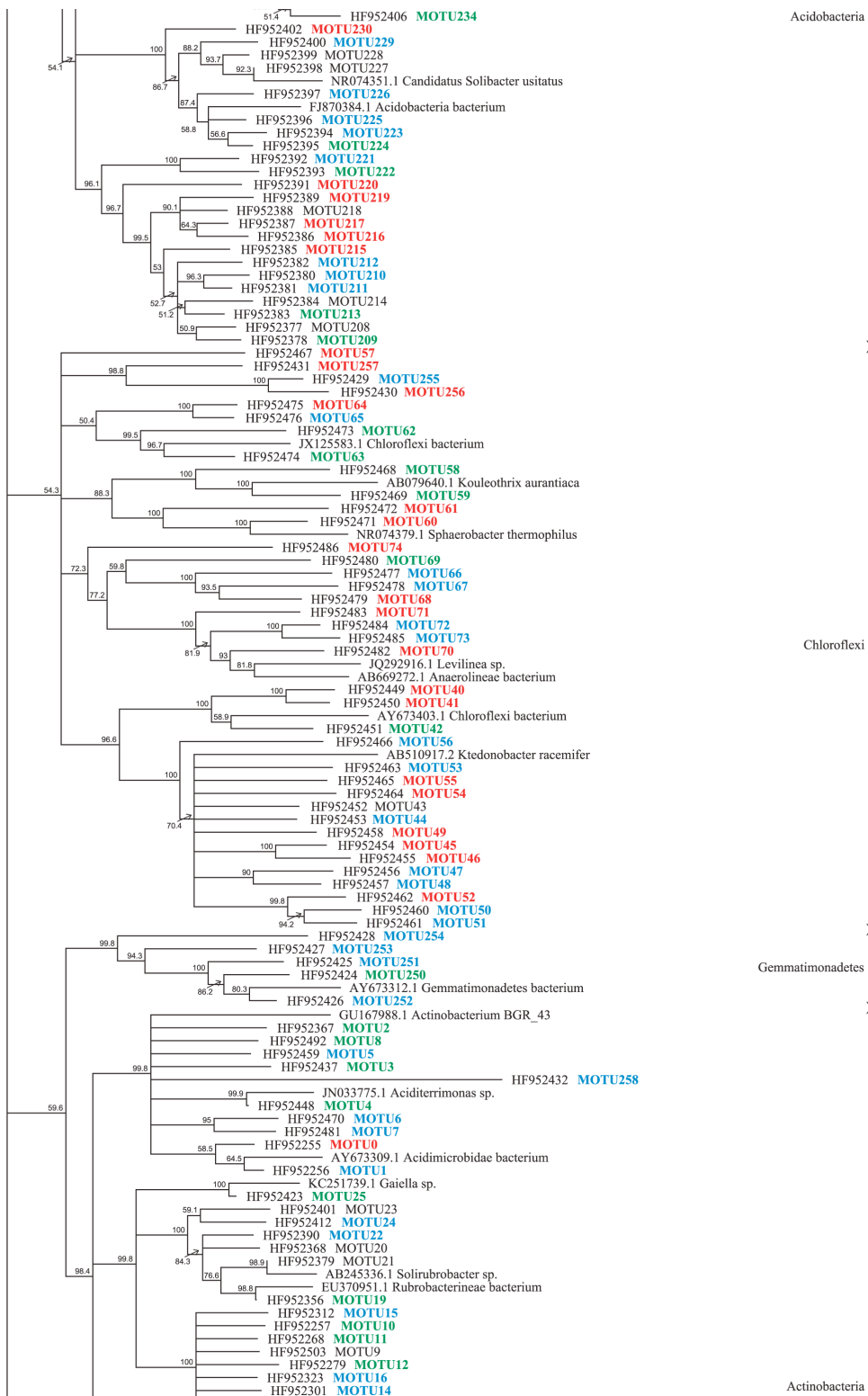
Table 18. Bacterial 16S rRNA sequences from high, medium or control CO₂ exposed soils. The relative abundance of taxa highlighted in bold is significantly ($P < 0.05$) different across sites. Letters indicate results of Tukey's contrasts post-hoc tests.

Deblo	Povprečno število sekvenc (\pm SD)			Skupaj
	Visok CO ₂	Srednji CO ₂	Kontrola	
<i>Acidobacteria</i>	13,0 \pm 1,0 ^a	14,3 \pm 5,1 ^a	10,7 \pm 3,8 ^a	114
<i>Actinobacteria</i>	4,7 \pm 3,1 ^a	9,7 \pm 3,8 ^a	8,0 \pm 5,6 ^a	67
<i>Armatimonadetes</i>	0,3 \pm 0,6 ^a	0 ^a	0 ^a	1
<i>Bacteroidetes</i>	0,7 \pm 0,6 ^a	0 ^a	3,0 \pm 2,0 ^a	11
<i>Caldiserica</i>	1,0 \pm 1,7 ^a	0 ^a	0 ^a	3
<i>Chloroflexi</i>	9,3 \pm 1,5 ^a	4,7 \pm 4,6 ^{ab}	1,7 \pm 2,1 ^b	47
<i>Firmicutes</i>	3,7 \pm 2,1 ^a	1,3 \pm 0,6 ^{ab}	0,3 \pm 0,6 ^b	16
<i>Gemmatimonadetes</i>	0 ^a	1,0 \pm 1,7 ^a	0,7 \pm 1,2 ^a	5
<i>Nitrospira</i>	0 ^a	0 ^a	0,3 \pm 0,6 ^a	1
<i>Planctomycetes</i>	0,7 \pm 0,6 ^a	0,3 \pm 0,6 ^a	2,7 \pm 3,1 ^a	11
<i>Proteobacteria</i>	14,3 \pm 4,2 ^{ab}	11,7 \pm 0,6 ^b	20,7 \pm 2,5 ^a	140
<i>Alphaproteobacteria</i>	5,0 \pm 2,6 ^a	4,7 \pm 1,5 ^a	8,0 \pm 4,6 ^a	53
<i>Betaproteobacteria</i>	4,0 \pm 3,0 ^a	2,7 \pm 1,2 ^a	3,0 \pm 3,6 ^a	29
<i>Gammaproteobacteria</i>	2,7 \pm 3,1 ^a	1,7 \pm 1,2 ^a	1,0 \pm 1,7 ^a	16
<i>Deltaproteobacteria</i>	2,7 \pm 2,6 ^a	2,7 \pm 1,5 ^a	8,0 \pm 2,0 ^b	40
<i>Verrucomicrobia</i>	0 ^a	7,0 \pm 6,1 ^a	2,3 \pm 1,5 ^a	28
WS3	0 ^a	0 ^a	0,3 \pm 0,6 ^a	1
Neklasificirani	6,7 \pm 3,5 ^a	4,7 \pm 3,2 ^a	6,7 \pm 1,5 ^a	54



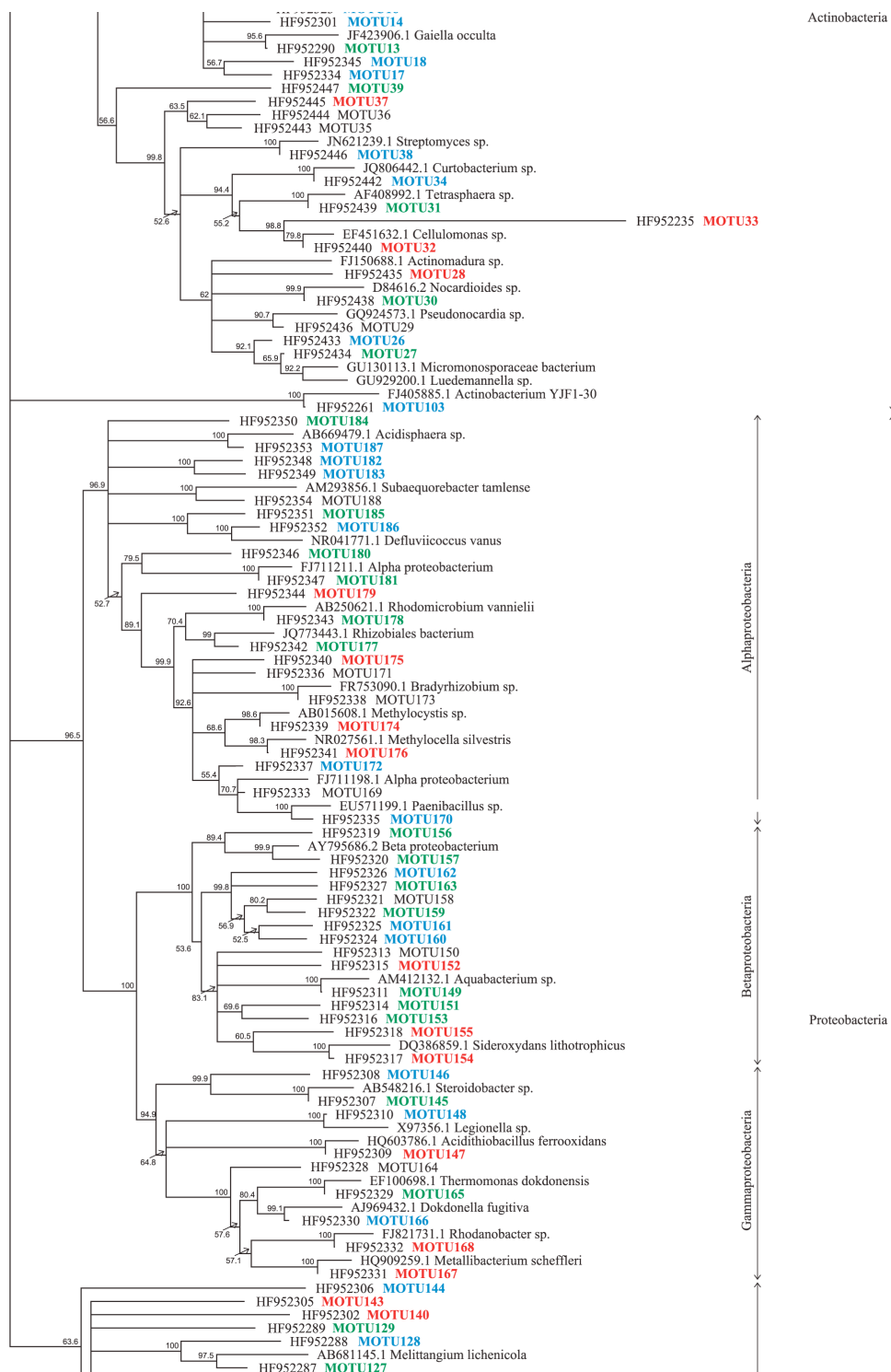
se nadaljuje

nadaljevanje



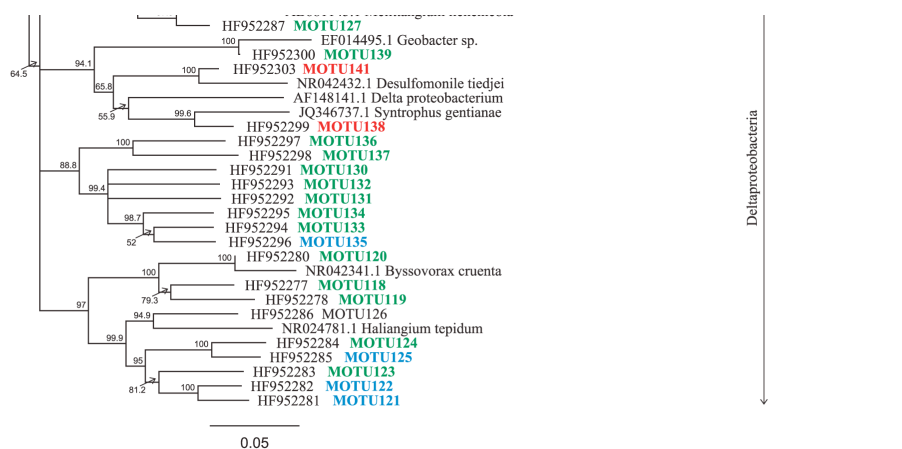
se nadaljuje

nadaljevanje



se nadaljuje

nadaljevanje



Slika 32. Filogenija MOTU bakterij, vzorčenih na travniških mofetah v okolici Stavešincev. Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distančne metode združevanja najbližjega soseda (»neighbor joining«). MOTU v rdeči barvi so bili prisotni samo v vzorcih iz območja z visoko koncentracijo CO₂, MOTU označeni z modro barvo, so bili prisotni samo na območju s srednjo koncentracijo CO₂, MOTU v zeleni barvi so bili prisotni samo na kontrolnem območju. MOTU v črni barvi niso lokacijsko specifični. MOTU, ki jih nismo mogli klasificirati v deblo ali razred (z uporabo baze RDP – The Ribosomal Database Project), so prikazani s prekinjeno vertikalno črto na desni strani drevesa. Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap«) s 1000 permutacijami.

Figure 32. Neighbor-joining phylogeny of bacterial MOTUs recorded at Stavešinci mofettes. MOTUs highlighted in red colour were only recorded in the high CO₂ exposed soils, MOTUs highlighted in blue colour were only recorded for medium CO₂ exposed soils and MOTUs highlighted in green colour were only recorded in control soils. MOTUs in black colour are not location (CO₂ exposition) specific. RDP – The Ribosomal Database Project unclassified MOTUs are marked with a brake in the line on the right side of the figure. Bootstrap values (1000 replicates) are shown above the branches and before the node to which they correspond.

4.4 RAZISKAVE BIODIVERZITETE KVASOVK NA OBMOČJU MOFET

Na območju travniških mofet v okolici Stavešincev smo z območij visoke koncentracije CO₂ in s kontrolnih območij izolirali in identificirali 8 izolatov kvasovk. Testirali smo sposobnost rasti teh kvasovk v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ ter določili njihovo sposobnost fermentacije D-glukoze. Dodatno smo pri kvasovki z najslabšo identifikacijo z iskalnim algoritmom BLAST, tj. pri kvasovki, identificirani kot *Occultifur species sp. nov.*, izvedli dodatne biokemijske teste ter jo primerjali z njenimi najbližjimi filogenetskimi sorodniki z namenom, da bi potrdili, ali gre res za novo, do sedaj še neopisano vrsto. Podrobnejši rezultati analiz sledijo v nadaljevanju.

4.4.1 Biodiverziteta kvasovk

Na območju travniških mofet v bližini Stavešincev smo z območij z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnih območij, z uporabo več različnih tehnik izolacije in več različnih gojišč (opis v poglavju 3.5.2), uspešno izolirali in identificirali 8 izolatov kvasovk (preglednica 19). Rezultati so pokazali, da smo z območij z visoko koncentracijo CO₂ izolirali tri različne izolate kvasovk, in sicer: potencialno novo vrsto kvasovke *Occultifur species sp. nov.* (najbolj podobna kvasovki *Occultifur externus*) ter vrsti *Rhodotorula glutinis* in *Wickerhamomyces anomalus*. Iz kontrolnega območja smo izolirali šest različnih vrst kvasovk, in sicer: *Candida sake*, *Candida vartiovaarae*, *Debaryomyces pseudopolymorphus*, *Rhodotorula glutinis*, *Ustilago davisii* in *Williopsis saturnus*. Na vseh izolatih smo preverili sposobnost rasti v anaerobnih loncih s koncentracijo 74 ± 16 % CO₂ v atmosferi anaerobnega lonca. Vse izolirane kvasovke smo shranili v zbirki ekstremofilnih gliv – EXF Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Pri kvasovki *Occultifur species sp. nov.* smo ugotovili najslabšo identifikacijo z algoritmom BLAST (podobnost sekvenc med kvasovko *Occultifur species sp. nov.* in njej najbližjim filogenetskim sorodnikom (baza NCBI) je bila 98 %; preglednica 19), medtem ko smo ostale izolate z algoritmom BLAST identificirali z vsaj 99 % podobnosti s sekvencami najbližjega filogenetskega sorodnika. Na izolatu *Occultifur species sp. nov.* smo zato izvedli dodatne biokemijske teste za primerjavo z drugimi vrstami kvasovk. Izvedli smo asimilacijske teste virov ogljika in dušika, test sinteze škroba, aktivnosti ureaze, sposobnosti fermentacije D-glukoze ter test rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂.

4.4.2 Fermentacija

Test sposobnosti kvasovk, da fermentirajo glukozo, smo naredili na treh izbranih izolatih kvasovk; *Occultifur* species sp. nov., *Candida vartiovaarae* in *Rhodotorula glutinis*, izoliranih iz tal travniške mofete. Rezultatom fermentacijskih testov izbranih kvasovk smo dodali še po literaturi povzeto sposobnost fermentacije D-glukoze (Kurtzman, 2011). Rezultate fermentacijskih testov (preglednica 19) smo nato primerjali z rezultati sposobnosti rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ (preglednica 19). Ugotovili smo, da so kvasovke, ki so sposobne fermentirati D-glukozo, sposobne tudi rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ (preglednica 19). Z območij z visoko koncentracijo CO₂ je to kvasovka *Wickerhamomyces anomalus*, s kontrolnih območij so to kvasovke *Candida sake*, *Candida vartiovaarae*, *Debaryomyces pseudopolymorphus* in *Williopsis saturnus*.

Preglednica 19. Pregled izolatov kvasovk iz tal travniških mofet v okolici Stavešincev ter pregled uporabljenih izolacijskih metod, rezultatov fermentacijskih testov, sposobnosti rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ ter terminov vzorčenja tal za izolacijo kvasovk.

Table 19. Overview of yeast isolates from soil of meadow mofette near Stavešinci with overview of isolation techniques used, results of fermentation tests, results of ability to grow in the atmosphere with increased concentration of CO₂ and dates of sampling the soil for yeast isolation.

Območje vzorčenja	Identifikacija BLAST (% prekritosti / % podobnosti)	Število izolatov	Izolacijska metoda ¹	Fermentacija glukoze ²	Rast v atmosferi s 74 ± 16 % CO ₂	Termin vzorčenja ³
visok CO ₂	<i>Occultifur</i> species sp. nov. (100/98)	4	redčitev	-	-	junij 2010
	<i>Rhodotorula glutinis</i> (100/100)	5	redčitev	-*	-	junij 2010
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (100/100)	8	bogatitev	+	+	november 2009
kontrola	<i>Candida sake</i> (100/99)	15	redčitev flotacija bogatitev	+	+	november 2009 junij 2010
	<i>Candida vartiovaarae</i> (100/100)	2	flotacija	+	+	junij 2010
	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> (99/99)	1	redčitev	+	+	junij 2010
	<i>Rhodotorula glutinis</i> (100/100)	4	redčitev	-*	-	junij 2010
	<i>Ustilago davisii</i> (100/99)	2	redčitev	-	-	junij 2010
	<i>Williopsis saturnus</i> (100/99)	14	bogatitev	+	+	november 2009

* fermentacija glukoze je povzeta po literaturi (Kurtzman, 2011).

¹ Izolacijske metode so podrobno predstavljene v poglavju 3.5.2.

² Fermentacijski testi so opisani v poglavju 3.5.4.

³ Opis vzorčenja je opisan v poglavju 3.5.1.

- Ne fermentira glukoze. Ne raste v atmosferi z visoko koncentracijo CO₂.

+ Fermentira glukozo. Raste v atmosferi z visoko koncentracijo CO₂.

4.4.3 Kvasovka *Occultifur species sp. nov.*

Kvasovka *Occultifur species sp. nov.* je imela najslabšo identifikacijo z iskalnim algoritmom BLAST. Da bi lahko potrdili, da gre res za novo, do sedaj še neopisano vrsto, smo primerjali rezultate biokemijskih testov med kvasovko *Occultifur species sp. nov.* in njenimi najbližjimi filogenetskimi sorodniki (*Occultifur externus*).

4.4.3.1 Fermentacija, aktivnost ureaze in sinteza škroba

Da bi lahko preverili, ali je kvasovka *Occultifur species sp. nov.* res do sedaj še neopisana vrsta, smo izvedli dodatne biokemijske teste na vseh štirih izolatih (uspešno smo izolirali 4 izolate kvasovke *Occultifur species sp. nov.*). Rezultati fermentacijskih testov, ureaznih testov in sinteze škroba kvasovke *Occultifur species sp. nov.* so pokazali, da kvasovka ni sposobna fermentirati glukoze (odsotnost CO₂ v Durhamovih cevkah, indikatorska barva je ostala zelena) in ne sintetizira škroba (jodavica je ostala vijolična). Test ureaze je bil pozitiven (sprememba barve iz roza v rumeno) za vse štiri izolate *Occultifur species sp. nov.*

4.4.3.2 Asimilacijski testi

Na gojišča z različnimi viri ogljika in dušika smo nacepili dva od štirih izolatov kvasovke *Occultifur species sp. nov.* Sposobnost rasti na različnih virih ogljika in dušika (asimilacijski testi) dveh od štirih izolatov *Occultifur species sp. nov.* (Zbirka ekstremofilnih gliv – EXF: izolat s kataloško številko EXF 6436 in izolat s kataloško številko EXF 6437) smo nato primerjali z v literaturi zabeleženimi asimilacijskimi testi za sposobnost rasti na različnih virih ogljika in dušika (CBS 8732T in IGC 4817; Sampaio in sod., 1999). Pregled rezultatov asimilacijskih testov je prikazan v preglednici 20.

Preglednica 20. Asimilacijski in fermentacijski testi ter test sinteze škroba dveh izolatov kvasovke *Occultifur* species sp. nov. in dveh izolatov kvasovke *Occultifur externus*.

Table 20. Assimilation and fermentation test and starch formation test of two yeast isolates *Occultifur* species sp. nov. and two yeast isolates *Occultifur externus*.

	<i>Occultifur</i> species sp. nov.		<i>Occultifur externus</i>	
	EXF 6436 ¹	EXF 6437 ¹	CBS 8732T ²	IGC 4817 ³
D-glukoza	+	+	+	+
D-galaktoza	+	+	počasna	+
L-sorboza	-	-	počasna	+
D-glukozamin	-	-	-	-
D-riboza	-	-	-	-
L-arabinoza	+	+	počasna	+
L-ramneza	-	-	-	-
D (+) trehaloza	+	+	+	+
D (+) celobioza	+	+	+	+
D (+) melibioza	-	-	-	-
rafinoza	šibka	šibka	-	-
škrob	-	-	-	-
glicerol	+	+	+	+
adonitol (ribitol)	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+
Myo-inozitol	-	-	-	-
sukcinat	+	+	+	+
citrat	+	+	počasna	+
dulcitol (galactitol)	-	-	-	-
fruktoza	+	+	ni podatka	ni podatka
D-sorbitol	šibka	šibka	ni podatka	ni podatka
glukuronat	+	+	+	+
nitrat (Kne3)	-	-	-	-
nitrit (Nane2)	-	-	-	-
L-lizin	+	+	+	+
5 % NaCl	-	-	ni podatka	ni podatka
10 % NaCl	-	-	počasna/šibka/-	ni podatka
5 °C	-	-	ni podatka	ni podatka
15 °C	+	+	25 °C +	ni podatka
30 °C	+	+	-	+
37 °C	-	-	-	35 °C -

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 20: Asimilacijski in fermentacijski testi ter test sinteze škroba dveh izolatov kvasovke *Occultifur species* sp. nov. in dveh izolatov kvasovke *Occultifur externus*

fermentacija glukoze	ne	ne	ne	ne
sinteza škroba	ne	ne	ne	ne
aktivnost ureaze	da	da	ni podatka	da

+ Rast kvasovk na posameznem viru ogljika ali dušika.

- Odsotnost rasti.

Šibka rast pomeni, da komaj zaznamo rast kvasovk.

Počasna rast pomeni, da so se znaki rasti začeli kazati po nekaj dneh.

¹ Kataloška številka izolata v zbirki EXF: Ekstremofilnih gliv, Oddelka za Biologijo, Biotehniške fakultete.

² Kataloška številka izolata v zbirki CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska.

³ Kataloška številka izolata v zbirki IGC: Yeast Culture Collection, Portugalska

API 20C AUX asimilacijski test

Dodatno smo izvedli asimilacijski test tudi s komercialnim testom API 20C AUX, s katerim smo testirali rast vseh štirih sevov kvasovke *Occultifur species* sp. nov. na različnih virih ogljika (preglednica 21). Po 72-urni inkubaciji na 25 °C smo zabeležili naslednje podatke o rasti vseh štirih izolatov *Occultifur species* sp. nov.

Preglednica 21. Asimilacijski testi štirih izolatov kvasovke *Occultifur* species sp. nov.

Table 21. Assimilation test of four yeast isolates *Occultifur* species sp. nov.

	<i>Occultifur</i> species sp. nov.			
	EXF 4636 ¹	EXF 4637 ¹	EXF 4673 ¹	EXF4682 ¹
glukoza (GLU)	+	+	+	+
glicerol (GLY)	+	+	+	+
2-keto-D-glukonat (2KG)	+	+	+	+
L-arabinoza (ARA)	+	š	+	+
D-xyloze (XYL)	+	+	+	+
adonitol/ribitol (ADO)	-	-	-	-
xylitol (XLT)	-	-	-	-
galaktoza (GAL)	-	-	-	-
inozitol (INO)	-	-	-	-
sorbitol (SOR)	-	š	-	-
alfa-metil-D-glucoside (MDG)	-	-	-	-
N-acetil-D-glukozamin (NAG)	š	+	+	+
celobioza (CEL)	-	-	-	-
laktoza (LAC)	-	š	-	-
maltoza (MAL)	š	+	+	+
saharoza (SAC)	-	š	+	š
trehaloza (TRE)	š	š	+	š
melozitoza (MLZ)	š	š	š	š
rafinoza (RAF)	-	-	-	-

+ Rast na izbranem viru ogljika

- Ni rasti.

»š« – šibka rast.

¹ Kataloška številka izolata v zbirki EXF: Ekstremofilnih gliv, Oddelka za Biologijo, Biotehniške fakultete.

4.4.3.3 Parjenje

Vse štiri izolirane seve kvasovke *Occultifur species* sp. nov. smo parili med seboj na gojiščih s koruznim agarjem CMA («Cornmeal Agar»), gojiščih s sladnim ekstraktom MEA («Malt Extract Agar») in gojiščih s krompirjevim agarjem in glukozo PDA («Potato Dextrose Agar») (Kurtzman, 2011), pri temperaturi 25 °C, 2 do 3 mesece. Zaradi odsotnosti hif sklepamo, da ni prišlo do parjenja med izolati kvasovke *Occultifur species* sp. nov. To pomeni, da ni prišlo do srečanja celice nasprotnega paritvenega tipa, kar je potrebno za uspešno parjenje.

4.4.3.4 Velikost celic

Velikost celic *Occultifur species* sp. nov. smo izmerili s programsko opremo Cell[^]B (Olympus) v vodnem mediju. Rezultati meritev so pokazali, da je povprečna dolžina posamezne celice $4,78 \pm 0,67 \mu\text{m}$ in povprečna širina posamezne celice $2,53 \pm 0,40 \mu\text{m}$. V preglednici 22 so podane podrobnejše meritve.

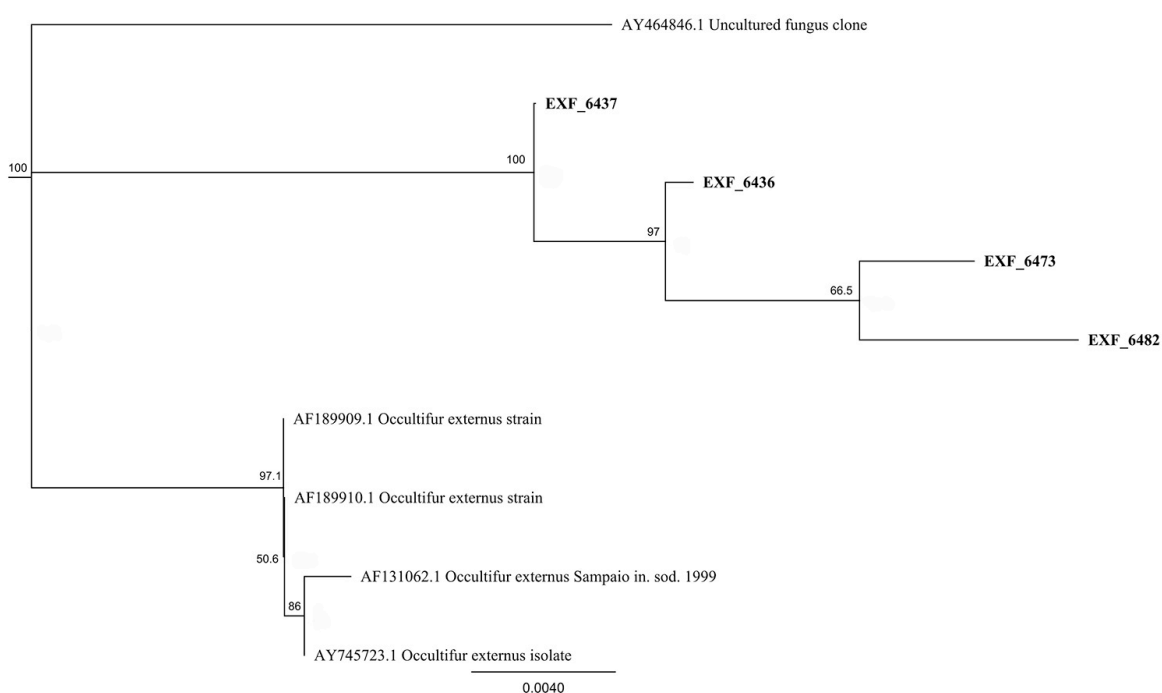
Preglednica 22. Dolžina in širina posameznih celic kvasovke *Occultifur species* sp. nov.

Table 22. Length and width of single cells of *Occultifur species* sp. nov.

Ponovitev	Dolžina (μm)	Širina (μm)	Število izmerjenih celic
1	$4,540274 \pm 0,927243$	$2,767056 \pm 0,219795$	10
2	$5,17577 \pm 0,385809$	$2,707268 \pm 0,144321$	50
3	$4,741917 \pm 0,439685$	$2,552622 \pm 0,238046$	50
4	$4,549508 \pm 0,468367$	$2,28886 \pm 0,226933$	50
5	$4,431055 \pm 0,67942$	$2,177308 \pm 0,3182$	50
6	$4,588324 \pm 0,959082$	$2,403045 \pm 0,496835$	23
7	$5,463456 \pm 0,439884$	$3,172095 \pm 0,312268$	15
8	$5,284125 \pm 0,528591$	$3,070225 \pm 0,2239$	17
skupaj	$4,77989 \pm 0,666419$	$2,530707 \pm 0,401973$	268

4.4.3.5 *Occultifur* species sp. nov. in najbližji sorodniki

Sekvence štirih sevov *Occultifur* species sp. nov., EXF 6437, EXF 6436, EXF 6473 in EXF 6482, izolirane z območij z visoko koncentracijo CO₂, smo z uporabo iskalnega algoritma BLAST primerjali z najbližjimi filogenetskimi sorodniki iz baze NCBI (National Center for Biotechnology Information; slika 32). Rezultati analize so pokazali, da so štirje sevi *Occultifur* species sp. nov. največ 98 % podobni najbližjim sorodnikom, kar skupaj z asimilacijskimi testi kaže, da gre najverjetneje za novo, še neopisano vrsto kvasovke.



Slika 33. Filogenija kvasovke *Occultifur* species sp. nov., vzorčene iz tal travniške mofete v okolici Stavešincev, ter najbližjih filogenetskih sorodnikov kvasovke *Occultifur* species sp. nov. Filogenetsko drevo smo naredili z uporabo distančne metode združevanja najbližjega soseda (»neighbor joining«). Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (»bootstrap values«) s 1000 permutacijami.

Figure 33. Neighbor-joining phylogeny of *Occultifur* species sp. nov. isolated from soil of meadow mofette near Stavešinci and their closest phylogenetic relatives. Bootstrap values (1000 replicates) are shown above the branches and before the node to which they correspond.

4.4.4 Testiranje rasti anaerobnih in fakultativno anaerobnih kvasovk v atmosferi CO₂

Fakultativna anaerobnost je poznana pri velikem številu kvasovk, od katerih lahko večina raste tudi v atmosferi CO₂ (Rodrigues in sod., 2006). Da bi ugotovili, ali obstaja povezava med sposobnostjo preživetja v atmosferi CO₂ in v literaturi zabeleženo fermentacijo, smo iz zbirke ekstremofilnih gliv EXF, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, izbrali 24 fakultativno anaerobnih kvasovk ter jih inkubirali pri atmosferi z 20 % O₂ in atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ (74 ± 16 % CO₂). Rezultati testa (preglednica 23) so pokazali, da večina kvasovk (7 izolatov), ki rastejo v atmosferi CO₂, tudi uspešno fermentira sladkorje v alkohol in ogljikov dioksid, kar pa ni veljalo za tri izolate.

Preglednica 23. Test rasti izbranih izolatov kvasovk iz zbirke ekstremofilnih kvasovk – EXF v atmosferi CO₂ (74 ± 16 %) in atmosferi O₂ (20 %) ter po literaturi povzeta fermentacija D-glukoze (Kurtzman, 2011).

Table 23. Growth test of selected yeast strains from the collection of extremophilic yeasts – EXF collection in CO₂ atmosphere (74 ± 16 %) and O₂ atmosphere (20 %) and their fermentation of D-glucose from literature (Kurtzman, 2011).

Ime vrste	Družina	Rast v atmosferi		Fermentacija D-glukoze
		O ₂	CO ₂	(povzeta po literaturi)
<i>Candida ethanolica</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Candida kefir</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Candida shehatae var. insectosa</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Candida zeylanoides</i>	Ascomycota	+	-	-
<i>Clavispora lusitaniae</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Cryptococcus diffluens</i>	Basidiomycota	+	-	-
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	Basidiomycota	+	-	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Basidiomycota	+	-	-
<i>Debariomyces hansenii</i>	Ascomycota	+	+	-
<i>Guehomyces pullulans</i>	Basidiomycota	+	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Kazakhstania unispora</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Ascomycota	+	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje

<i>Rhodosporidium lusitaniae</i>	Basidiomycota	+	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Basidiomycota	+	-	-
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Ascomycota	+	+	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Ascomycota	+	-	+

CO₂ Atmosfera s povečano koncentracijo 74 ± 16 % CO₂.

O₂ Atmosfera z 20 % O₂.

- Ne fermentira D-glukozo. Ne raste v atmosferi z visoko koncentracijo CO₂.

+ Fermentira D-glukozo. Raste v atmosferi z visoko koncentracijo CO₂.

5 RAZPRAVA

Delo, ki je potekalo v okviru doktorske disertacije, je bilo osredotočeno predvsem na raziskave vpliva različnih okoljskih dejavnikov na sestavo združb arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv ter združb arhej in bakterij v ekstremnih razmerah na območjih naravnih izvirov CO₂ ali mofet. Zaradi izhajanja geološkega plina so združbe talnih mikroorganizmov na teh območjih izpostavljene dolgotrajnim vplivom povečane koncentracije talnega CO₂ ter s tem inducirane hipoksije. Dodatno smo v doktorsko disertacijo vključili tudi raziskave diverzitet kvasovk, izoliranih iz tal travniških mofet v okolici Stavešincev. V nadaljevanju je diskusija razdeljena na tri sklope raziskav, ločeno za AM glive, bakterije in arheje ter za kvasovke.

Večji del raziskav je bil izveden na travniških mofetah v okolici Stavešincev. Dodatno smo, za analizo vpliva abiotičnih dejavnikov okolja na združbe AM gliv na večji prostorski skali, v raziskavo vključili tudi gozdne mofete na Stavešinskem vrhu, češke mofete v okolici Cheba ter italijanske mofete Bossoleto v Toskani.

5.1 ARBUSKULARNE MIKORIZNE GLIVE

5.1.1 Kolonizacija rastlinskih korenin z AM glivami

Kolonizacijo korenin z AM glivami smo ocenili na koreninah rastlin, vzorčenih z območja travniških mofet v okolici Stavešincev v letu 2010. Ugotovili smo, da so z AM glivami kolonizirane tudi korenine rastlin, ki rastejo na mestih, kjer smo v tleh izmerili zelo visoko koncentracijo CO₂, kar potrjujejo tudi druge raziskave (npr. Maček in sod., 2011, 2012). Statistično značilne povezave med parametri kolonizacije korenin z AM glivami in koncentracijo CO₂ v tleh nismo ugotovili. Prav tako nismo ugotovili statistično značilne povezave med parametri kolonizacije korenin in različnimi meseci vzorčenja. O manjši gostoti arbuskulov na območjih z visoko koncentracijo CO₂, v primerjavi s kontrolnimi območji, poročajo Maček in sod. (2011), kjer je bila povprečna gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo, 37 % na območjih z visoko koncentracijo CO₂ in 76 % na kontrolnih območjih (Maček in sod., 2011). Vrednosti so primerljive z našo raziskavo, kjer se je povprečna gostota arbuskulov gibala med 26 % in 35 % na območjih z visoko koncentracijo CO₂ in med 38 % in 48 % na kontrolnih območjih (preglednica 15).

Na območju travniških mofet smo naredili botanični popis vrst (preglednica 9), kjer smo zabeležili 27 različnih rastlinskih vrst na območjih z visoko koncentracijo CO₂ in 34 različnih rastlinskih vrst na kontrolnih območjih. Po pregledu literaturnih podatkov o filogenetski porazdelitvi in evoluciji mikoriznih in nemikoriznih rastlin (Wang in Qiu, 2006) in glede na botanični popis lahko zaključimo, da sta na območjih z visoko koncentracijo CO₂ prisotni samo dve vrsti gostiteljskih rastlin, ki veljata za nemikorizni, to sta pohojena dresen (*Polygonum arenastrum* Boreau.) in gozdni sitec *Scirpus sylvaticus* L.

ter na kontrolnih območjih klobčasta smiljka *Cerastium glomeratum* Thuill. in gozdni sitec *Scirpus sylvaticus* L. Rastlina *P. arenastrum* se pojavi samo na območjih z visoko koncentracijo CO₂, medtem ko smo *C. glomeratum* našli samo na kontrolnih območjih. V določenih izvrtkih tal se lahko pojavijo korenine tako rastlinskih vrst, ki ne tvorijo simbioze z AM glivami, kot tistih, ki jo. Znano je, da mikorizne rastline vplivajo na nemikorizne in obratno (Lambers in Teste, 2013). Nemikorizne rastline lahko začnejo sproščati alelopatske snovi v tla in tako vplivajo na rast in razvoj AM gliv v tleh, oziroma lahko olajšujejo mikoriziranim rastlinam pridobivanje fosforja in mangana iz tal (povzeto po Lambers in Teste, 2013). Mikorizirane rastline pa lahko uporabijo AM glive v kompeticiji za prostorsko prevlado nad nemikoriziranimi rastlinami (Veiga in sod., 2013; povzeto po Lambers in Teste, 2013).

Znano je, da se nadzemna diverzitet rastlinske združbe razlikuje od podzemne diverzitet rastlin (Mommer in sod., 2008, 2011). Sestavo podzemne združbe rastlin bi lahko določili na podlagi analize DNK korenin z uporabo črtne kode *trnL* (npr. Dumbrell in sod., 2010a; Mommer in sod., 2011). Na ta način bi lahko povezali združbo gostiteljskih rastlin s kolonizacijo AM gliv v koreninah te rastlinske združbe. Ker je bil glavni povod za oceno kolonizacije korenin z AM glivami samo preliminarna potrditev, da lahko dokažemo prisotnost AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev tudi z metodami, ki temeljijo na morfologiji, smo uporabili majhno število analiziranih korenin (glej poglavje 3.3.2) iz talnih izvrtkov. Tako smo lahko potrdili prisotnost kolonizacije z AM glivami v koreninah rastlin z območij z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnih območij. Dodatno smo tudi potrdili prisotnost arbuskulov v koreninah rastlin tudi na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Na podlagi teh rezultatov smo se nato odločili narediti analizo sestave združbe AM gliv v koreninah rastlin, ki nam je omogočila molekulsko identifikacijo AM gliv, kar je nemogoče na podlagi same morfologije AM gliv v koreninah rastlin (Merryweather in Fitter, 1998).

O razliki med parametri kolonizacije z AM glivami med območji z različno koncentracijo CO₂ ne moremo poročati, verjetno tudi zaradi premajhnega števila analiziranih fragmentov korenin pri naši raziskavi. Kolonizacija korenin z AM glivami lahko zelo variira, tako prostorsko (Klironomos in sod., 1993; He in sod., 2002) kot časovno (Klironomos in sod., 1993; Husband in sod., 2002), zato pri oceni različnih parametrov kolonizacije korenin z AM glivami lahko prihaja do velikih odstopanj, odvisno tudi od časa in načina vzorčenja. V naši raziskavi smo vzorčili korenine iz talnih izvrtkov, kar pomeni, da smo zajeli samo določene dele korenin okoliških rastlin. Rastline iste vrste, ki rastejo skupaj, lahko imajo različno sestavo združb AM gliv (Vandenkoornhuyse in sod., 2003) in prav tako lahko različne AM glive kolonizirajo različno velik odstotek korenine ene rastline (Helgason in sod., 2002). To je lahko dodaten razlog, da med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji nismo opazili značilnih razlik pri ocenah različnih parametrov kolonizacije korenin z AM glivami. V nasprotju z našo študijo so Maček in sod. (2011) na

območju travniških mofet v okolici Stavešincev preučevali kolonizacijo z AM glivami v koreninah posameznih rastlinskih vrst. Rezultati njihove študije so pokazali statistično značilno manjšo kolonizacijo korenin z AM glivami na območjih z visoko koncentracijo CO₂ v primerjavi s kontrolnimi območji. Vsekakor pa gre poudariti, da vse objavljene študije poročajo o prisotnosti AM gliv v koreninah posameznih rastlinskih vrst (Maček in sod., 2011; Kosi, 2012) in koreninah mešanih rastlinskih vrst (Maček in sod., 2012), vzorčenih na območjih z močno povečano koncentracijo CO₂ v tleh. Omenjene raziskave tudi poročajo o prisotnih arbuskulih v koreninah rastlin vzorčenih na območjih z močno povečano koncentracijo CO₂. Arbuskuli so indikator fiziološko aktivne simbioze (Smith in Read, 2008), iz česar lahko sklepamo, da tudi na najbolj ekstremnih lokacijah še vedno prihaja do izmenjave hranil med rastlinskim partnerjem in AM glivami.

5.1.2 Vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv

Doktorska disertacija predstavlja prvo študijo, v kateri smo variabilnost v sestavi združb AM gliv na območju naravnih izvirov CO₂, imenovanih tudi mofete, določili na podlagi pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche). Na območju mofet smo raziskovali vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv tako na manjši prostorski skali, na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, kot tudi na večji prostorski skali, kjer smo poleg omenjene mofete vključili še gozdne mofete na Stavešinskem vrhu, italijanske mofete Bossoleto in češke mofete v okolici Cheba. Gre za prvo raziskavo, kjer smo na območju travniških mofet vzorčili AM glive večkrat tekom rastne sezone (od aprila do oktobra) v dveh zaporednih letih (2010 in 2011). Študij, ki poročajo o spremembah v sestavi združb AM gliv tekom rastne dobe, ni veliko (Rosendahl in Stukenbrock, 2004; Santos - González in sod., 2007; Dumbrell in sod., 2011; Davison in sod., 2012), še manj pa je študij, ki so primerjale sestavo združb AM gliv tako tekom rastne dobe kot tudi med dvema rastnima dobama, tj. med leti (Dumbrell in sod., 2011).

Na območju travniških mofet smo opisali razlike v sestavi združb AM gliv na podlagi pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche). Na podlagi 97 % podobnosti sekvenc smo identificirali 32 MOTU (molekulskih operativnih taksonomskih enot) s skupno 25.685 sekvencami AM gliv. O podobnem številu identificiranih MOTU na podlagi pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche) poročajo tudi v drugih študijah, kjer so v različnih tipih travišč identificirali 70 MOTU AM gliv na podlagi male podenote ribosoma (SSU) rRNK (Dumbrell in sod., 2011) in 32 MOTU AM gliv na podlagi velike podenote ribosoma (LSU) rRNK (Lekberg in sod., 2012). Krivulje redčenja MOTU so se v večini primerov na območju travniških mofet približale asimptoti, zaradi česar lahko povzamemo, da bolj intenzivno vzorčenje ne bi identificiralo bistveno večjega števila dodatnih MOTU oziroma, da se pestrost MOTU ne bi povečala z dodatnim vzorčenjem. Krivulje redčenja vrst nam omogočajo standardizacijo različnih setov podatkov o pestrosti različnih vrst

organizmov, kar nam tako omogoča primerjavo teh podatkov med seboj (Gotelli in Colwell, 2001). Standardizacija podatkov o sestavi združb organizmov je ključnega pomena pri kvantifikaciji in primerjavi pestrosti vrst v ekoloških študijah (Gotelli in Colwell, 2001). Čeprav je še vedno veliko ekoloških študij, kjer niso upoštevali vpliva abundance in intenzitete vzorčenja na pestrost vrst (npr. Orgiazzi in sod., 2013), je večina študij preučevano območje dobro povzročila (npr. Lekberg in sod., 2012). Naši rezultati so pokazali, da smo območje travniških mofet dobro povzročili, kar nam tako omogoča primerjavo med sestavo združb AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂ in s kontrolnih območij. Vizualna analiza krivulj redčenja MOTU (slika 15) in krivulj kopičenja MOTU (slika 16 in slika 17) je pokazala, da smo v vzorcih korenin iz leta 2010 našli manjše število sekvenc AM gliv (10.916), v primerjavi z vzorci iz leta 2011 (14.769). Eden od potencialnih vzrokov za manjše število sekvenc AM gliv v letu 2010 bi lahko bil tudi ta, da smo v drugem letu vzorčenja (2011) očiščene korenine rastlin hitro zamrznili v tekočem dušiku in jih do izolacije DNK shranili v zamrzovalniku (za dodatne analize RNK iz istih vzorcev, kar pa ni obravnavano v sklopu te doktorske disertacije). Prav tako smo v letu 2011 uporabili drug kit za izolacijo DNK iz korenin rastlin. Različna priprava vzorcev in uporaba različnih izolacijskih kitov bi lahko vplivala na količino celokupne izolirane DNK. Ta v primeru izolacije DNK iz rastlinskih korenin vsebuje mešanico tako rastlinske DNK, DNK AM gliv kot tudi DNK drugih mikroorganizmov, kot npr. DNK bakterijskih endofitov (Manter in sod., 2010) in temnih septiranih glivnih endofitov (DSE) (Knapp in sod., 2012). Ni pa razloga, da bi sklepali, da različna količina celokupne izolirane DNK vpliva na boljšo ali slabšo ekstrakcijo in kasnejšo amplifikacijo DNK specifičnih MOTU AM gliv iz koreninskega materiala. Da bi to potrdili, smo normalizirali število sekvenc na zgolj 200 sekvenc na vzorec in na ta način primerjali število sekvenc AM gliv v vzorcih, vzorčenih v letu 2010 in v letu 2011. V tem primeru razlik v številu sekvenc med leti 2010 in 2011 nismo več opazili (rezultati niso prikazani). Iz tega lahko povzamemo, da razlika v številu sekvenc AM gliv med letoma 2010 in 2011 ni posledica uporabe različnih tehnik priprave vzorcev in uporabe različnih izolacijskih kitov, kar skupaj z dejstvom, da se je večina krivulj redčenja MOTU približala asimptoti kaže na to, da je bilo vzorčenje združb AM gliv iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev dovolj intenzivno in tako pridobljeni podatki zadoščajo za nadaljnje analize in primerjave sestave združb AM gliv iz območja travniških mofet v okolici Stavešincev izpostavljeni različni koncentraciji geološkega plina.

Deterministični procesi (teorija okoljskih niš), ki vplivajo na strukturiranje združb AM gliv na območju travniških mofet

Rezultati naše raziskave kažejo, da na območju travniških mofet v okolici Stavešincev obstajata dva tipa združb AM gliv, ki sta specifična in prilagojena na lokalne ekstremne abiotske razmere. Prvi tip je z območij z visoko koncentracijo CO₂ v tleh in drugi tip s

kontrolnih območij (kanonična korespondenčna analiza – CCA; ločevanje tipov združb AM gliv po CCA osi 1, slika 18). Prostorska in časovna stabilnost talnih koncentracij CO₂ in O₂ na območju travniških mofet je že bila potrjena (Vodnik in sod., 2006, 2009), zato območje predstavlja dober modelni sistem za raziskave vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo mikrobnih združb (Maček in sod., 2011). Rezultati naše študije potrjujejo, da dolgotrajni abiotski selekcijski pritiski vodijo do trajnih sprememb v sestavi združb AM gliv.

Maček in sod. (2011) poročajo o pojavu specifičnih taksonov AM gliv na območjih z visoko koncentracijo geološkega CO₂ v tleh, kar kaže na prilagajanje AM gliv na določene abiotske dejavnike, kot posledico odziva na dolgotrajni selekcijski pritisk. Poročajo tudi o statistično značilni razliki v sestavi združb med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji (beta diverziteta), kar potrjujejo tudi rezultati ordinacijske analize v naši študiji. Čeprav je bilo največ variabilnosti znotraj združbe AM gliv s celotnega območja travniških mofet pojasnjeno z vrednostjo pH v tleh ($R^2 = 0,94$), sta koncentraciji CO₂ ($R^2 = 0,77$) in O₂ ($R^2 = 0,72$) direktno korelirani s CCA osjo 1 v enaki smeri, kot sta se združbi AM gliv tudi značilno ločevali (ANOVA; $P < 0,001$) (slika 18). Prav tako sta bili koncentraciji CO₂ in O₂ konstantno statistično značilno različni med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji pri vseh vzorčenih terminih, medtem ko to ni veljajo za vrednost pH v tleh (preglednica 7). To kaže, da je razlika v sestavi združb AM gliv med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji primarno posledica spremembe lokalnega plinskega režima, torej povečane koncentracije talnega CO₂ in posledično inducirane hipoksije. Močan vpliv pH na razlike v sestavi združb AM gliv s kontrolnih območij (glej sliko 18) in dejstvo, da je zakisanje tal povezano s povečano koncentracijo CO₂ v tleh (Jamnik, 2005) pojasnita, zakaj se pH pojavlja kot okoljski vektor, ki pomembno vpliva na sestavo združb AM gliv. Pomen vpliva pH, kot glavnega abiotskega dejavnika, na razlike v sestavi združb AM gliv, so preučevali Dumbrell in sod. (2010a). Raziskovali so, kateri procesi (za opis procesov glej poglavje 2.2.1.3), deterministični procesi (teorija okoljskih niš) ali stohastični procesi (nevtralna teorija), najboljše pojasnijo spremembe v sestavi združbe AM gliv, vzorčene z območja z gradientom pH vrednosti (od 3,72 do 8,04). Čeprav so našli dokaze, da tako teorija okoljskih niš kot nevtralna teorija vplivata na sestavo združb AM gliv, so bili dokazi v prid teoriji niš. Ta je pokazala, da diferenciacija niš temelji na vplivu abiotskih dejavnikov okolja, predvsem pH z zanemarljivim vplivom gostiteljskih rastlin. Njihova študija je tudi pokazala, da se združba AM gliv predvidljivo odziva na glavne abiotske dejavnike, torej pH, vendar je tudi pod vplivom stohastičnih procesov. Naši rezultati z območja mofet z dolgoročnimi vplivi povečane koncentracije CO₂ v tleh, in s tem inducirane hipoksije na sestavo združb AM gliv, se v tem pogledu povsem ujemajo z ugotovitvami Dumbrell in sod. (2010a). Kot kaže, so pri strukturiranju združb AM gliv v naravnem okolju daleč najbolj pomembni deterministični procesi (torej abiotski dejavniki okolja), kar podpira teorijo okoljskih niš.

Stohastični procesi (nevtralna teorija), ki vplivajo na variabilnost v sestavi združb AM gliv

Sestavo združb AM gliv med različnimi leti so po nam znanih podatkih raziskovali izključno v študiji Dumbrell in sod., (2011), medtem ko je študij, ki poročajo o spremembah v sestavi združb AM gliv tekom rastne dobe, nekoliko več (Rosendahl in Stukenbrock, 2004; Santos - González in sod., 2007; Dumbrell in sod., 2011; Davison in sod., 2012). V naših podatkih opazimo značilen vpliv leta ($R^2 = 0,48$) na sestavo združb, ki ima večji vpliv na variabilnosti znotraj združb AM gliv, kot ga imata razpoložljivi fosfor ($R^2 = 0,46$) in skupni dušik ($R^2 = 0,45$) v tleh. Razliko v sestavi združb AM gliv med letoma 2010 in 2011 bi lahko razložili z nevtralno teorijo, ki opisuje stohastične procese. Torej, kateri AM takson iz celotnega nabora MOTU je prvi, ki po koncu zime pride do največ asimilatov, in je zato v tistem letu najbolj abundanten (Dumbrell in sod., 2011). Tekom rastne dobe rastlin je AM glivam na voljo vedno večja količina ogljika, ki omogoča hitro rast določenim taksonom AM gliv (znotraj nabora MOTU določene okoljske niše), torej tistim, ki prvi dobijo večji dotok teh asimilantov. Ta stohastični vzorec, ki določa sestavo združb AM gliv, se pogosto kaže tudi v dominanci posameznih taksonov AM gliv (Dumbrell in sod., 2010b) znotraj združbe. Teorija pojasni rezultate, opisane v naši študiji. Med dvema rastnima sezonama (leto 2010 in 2011) lahko opazimo spremembo v vrstnem redu dominance najbolj abundantnih MOTU AM gliv (slika 21), medtem ko sam nabor MOTU znotraj okoljske niše (visok CO₂ ali kontrola) med leti ostaja podoben (slika 22).

V različnih študijah poročajo o različnih vplivih sezone oz. letnega časa na dinamiko sestave združb AM gliv (npr. Rosendahl in Stukenbrock, 2004; Santos - González in sod., 2007; Dumbrell in sod., 2011; Davison in sod., 2012; Bennett in sod., 2013). O vplivu različnih mesecev vzorčenja na dinamiko sestave združb AM gliv poročajo v študiji Bennet in sod. (2013), medtem ko sprememb v sestavi združb AM gliv tekom obdobja rasti rastlin niso opazili Rosendahl in Stukenbrock (2004), Santos - González in sod. (2007), Dumbrell in sod. (2011) in Davison in sod. (2012). Na območju travniških mofet v okolici Stavešincev nismo opazili vpliva različnih mesecev vzorčenja (od aprila do oktobra, v dveh zaporednih rastnih sezonah) na sestavo združb AM gliv z omenjenega območja. V študiji, kjer so preučevali vpliv sezone na spremembo v sestavi združb AM gliv (npr. Dumbrell in sod., 2011), poročajo, da se na raziskovanem območju tvorita dva značilno različna tipa združb AM gliv, torej zimska (od meseca januarja do meseca aprila – prehod zime v pomlad) in poletna (od meseca aprila do meseca novembra – obdobje rasti rastlin) združba AM gliv. Hitra sprememba v sestavi združbe se je v študiji Dumbrell in sod. (2011) zgodila v mesecu aprilu ob povišanju temperature in s tem z večjo razpoložljivostjo fotoasimilatov v sistemu rastlina-AM glive. Na tem mestu je pomembno omeniti, da je bila minimalna povprečna temperatura pred zimskim vzorčenjem > 1 °C, kar kaže na blago zimo (Velika Britanija), kjer tla tekom zimskega vzorčenja niso bila zamrznjena (Dumbrell in sod., 2011), kot se to dogaja na naših vzorčnih lokacijah tekom zime. Sprememb v sestavi združbe AM gliv tekom obdobja rasti rastlin (od maja do oktobra) prav tako niso

opazili Rosendahl in Stukenbrock (2004) (travišča), Santos - González in sod. (2007) (travišča) ter Davison in sod. (2012) (gozd). Sestava združbe AM gliv se tudi v naši študiji med različnimi meseci vzorčenja (med aprilom in oktobrom) ni spreminjala, kar je v skladu z ugotovitvami zgoraj navedenih objav.

Poleg same sestave lahko dinamiko združb AM gliv in njihovo biodiverzitetu v okoljskih vzorcih pojasnimo tudi z diverzitetnimi indeksi. Dumbrell in sod. (2011) poročajo tudi, da je imela poletna združba AM gliv podobno alfa diverzitetu (Simpsonov indeks – izenačenost vrst) ter podobno sestavo združb AM gliv tekom vzorčenja. Skladno s temi ugotovitvami tudi v naši raziskavi nismo opazili statistično značilnih razlik v alfa diverziteti AM gliv (Hillova števila, glej rezultate v poglavju 4.2.2.4) iz vzorcev, vzorčenih tekom rastne dobe (od aprila do oktobra) s kontrolnih območij. Prav tako ni bilo razlike v alfa diverziteti MOTU (Hillovo število 0 – pestrost vrst) z območij z visoko koncentracijo CO₂, medtem ko smo opazili razliko med diverzitetu AM gliv (Hillovo število 2 – izenačenost vrst in Hillovo število ∞ – dominanca vrst) z območij z visoko koncentracijo CO₂. Diverzitetni indeksi, izračunani na podlagi naših rezultatov, torej potrjujejo (glej tudi poglavje 5.1.3) obstoječe raziskave, ki pravijo, da je variabilnost v sestavi združb AM gliv v času rastne sezone primarno posledica determinističnih odzivov združbe AM gliv na lokalne abiotske dejavnike tal (Dumbrell in sod., 2010a), v našem primeru na povečano koncentracijo CO₂, s tem inducijo hipoksijo ter spremembami v pH tal.

Doktorska disertacija predstavlja prvo študijo, kjer smo raziskovali tako vpliv abiotskih dejavnikov na sestavo združb AM gliv kot tudi variabilnost združb AM gliv med dvema rastnima dobama, torej med mesecema aprilom in oktobrom v dveh zaporednih letih. Opazovali smo tudi spremembe v združbi AM gliv tekom rastne dobe; in dodatno tudi vpliv abiotskih dejavnikov okolja na variabilnost združb AM gliv na večji prostorski skali. Na podlagi zgoraj opisanih in interpretiranih rezultatov lahko zaključimo, da za območje travniških mofet v okolici Stavešincev velja, da je sestava združb AM gliv (a) primarno odvisna od determinističnih procesov vpliva abiotskih dejavnikov okolja. To velja predvsem za vpliv pH tal ter koncentracijo CO₂ in z njo povezano hipoksijo. (b) Opazili smo tudi, da se je združba AM gliv med dvema rastnima dobama razlikovala. Ta razlika v sestavi združb AM gliv med letoma 2010 in 2011 se pojavi kot posledica stohastičnih procesov, ko iz nabora MOTU prisotnih v koreninah rastlin tekom poletja dominirajo tisti, ki so prvi dobili večje količine asimilantov ob koncu zime. (c) Variabilnosti v sestavi združb AM gliv med združbami AM gliv vzorčenimi v različnih mesecih tekom rastne dobe nismo ugotovili.

Vpliv abiotičnih dejavnikov na variabilnost v sestavi združb AM gliv na večji prostorski skali

Vpliv abiotičnih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv smo dodatno analizirali tudi na večji prostorski skali, tj. na geografsko oddaljenih mofetah (slika 19). Poleg že omenjenih travniških mofet v okolici Stavešincev smo vzorčili še območje gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, območje čeških mofet v okolici Cheba in območje italijanskih mofet Bossoleto (glej poglavje 3.2 za opis lokacij in poglavje od 3.3.1 za opis vzorčenja korenin rastlin). Na vseh lokacijah skupaj smo identificirali 37 MOTU s skupno 37.757 sekvencami AM gliv, kjer je večji del sekvenc izhajal iz vzorcev korenin, vzorčenih z območij travniških mofet v okolici Stavešincev (25.658 sekvenc iz 44 vzorcev mešanih korenin več rastlinskih vrst), sledila so območja gozdnih mofet (6.776 sekvenc iz 14 vzorcev mešanih korenin več rastlinskih vrst), italijanskih mofet (4.368 sekvenc iz 8 vzorcev korenin posamezne vrste rastlin, ločeno za posamezno rastlinsko vrsto in za območje z različno koncentracijo CO₂), in čeških mofet (928 sekvenc iz 2 združenih vzorcev, ločeno za visok CO₂ in kontrolo, korenine vrste *Deschampsia caespitosa*). Izbranim območjem mofet je skupna predvsem močna abiotična selekcija, torej povečana koncentracija CO₂ in s tem inducirana talna hipoksija. Lokacije se med seboj razlikujejo po nekaterih talnih parametrih (preglednica 7, preglednica 10, preglednica 11 in preglednica 12) in po sestavi rastlinskih združb gostiteljskih rastlin. Rezultati naše raziskave potrjujejo, da na praktično vseh obravnavanih območjih mofet opazimo dva tipa združb AM gliv, združbo z območij z visoko koncentracijo CO₂ v tleh in združbo s kontrolnih območij, ki se ločujeta v smeri abiotičnih vektorjev CO₂ ter O₂ (slika 19). Izjema je italijanska mofeta, kjer je bilo vzorčenje izvedeno leta 2008 in imamo namesto koncentracij CO₂ v tleh, izmerjene vrednosti toka CO₂ iz tal z aparatom Li-6400 (Licor, ZDA) (preglednica 12), ker v času vzorčenja nismo imeli dostopa do analizatorja plinov GA2000+ (Ansyco, Nemčija), s katerim sicer merimo koncentracije plinov v tleh. Vrednosti toka CO₂ so se na območjih visoke vrednosti CO₂ v povprečju gibale med 40 in 270 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ in so neposredno povezane s koncentracijo talnega CO₂ (Vodnik in sod., 2009). Vodnik in sod. (2009) poročajo o pozitivni povezavi med koncentracijo CO₂ v talnem zraku in vrednostmi iztoka (fluksa) CO₂ iz tal, na podlagi katere lahko podamo grobo oceno koncentracij CO₂ na območju mofete Bossoleto, ki se giblje med 15 in 80 % CO₂ v tleh. Slednje koncentracije so primerljive s povprečnimi vrednostmi koncentracije CO₂, ki so bile izmerjene na ostalih območjih z visoko koncentracijo CO₂ (> 59 %, preglednica 7), ki smo jih zajeli znotraj te doktorske disertacije.

Koncentracija CO₂ v tleh je statistično značilno negativno povezana s koncentracijo O₂ v tleh ($R^2 = 0,95$ za travniške mofete v okolici Stavešincev), zato koncentracijo O₂ v tleh lahko izračunamo po formuli ($\% O_2 = -0,17 \times \% CO_2 + 19,8$). Glede na vse podatke o izmerjenih koncentracijah CO₂ in O₂ na travniških mofetah v okolici Stavešincev lahko ugotovimo, da je pri koncentracijah okoli 20 % CO₂ še 16 % O₂, medtem ko je pri 60 % CO₂ le še 9 % O₂. Iz tega lahko sklepamo, da v primerih nižjih koncentracij CO₂, npr. 20

% CO₂, vsebnost O₂ 16 % in je tako podobna koncentraciji O₂ v kontrolnih tleh, ki je okoli 20–22 % (preglednica 7). Koncentracija O₂ je eden glavnih abiotskih dejavnikov, ki vplivajo na vse žive organizme, vključno z mikrobnimi združbami arhej in bakterij na območjih mofet (poglavje 4.3; Šibanc in sod., 2014). V primeru italijanskih mofet lahko rečemo, da je koncentracija O₂ med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji bolj podobna kot pri ostalih naravnih izviri CO₂, saj smo na območju izmerili nižje koncentracije CO₂ v primerjavi z ostalimi vzorčenimi mofetami. Prav tako je večja razlika tudi pri ostalih talnih dejavnikih (pH, P₂O₅ in skupni N), kar je razvidno iz ordinacije CCA (slika 19), saj se območje italijanskih mofet v smeri omenjenih talnih dejavnikov odmika od ostalih mofet. Eden izmed talnih dejavnikov, ki bi še lahko pomembno vplival na sestavo združb AM gliv na območju italijanskih mofet, je prisotnost manjših količin vodikovega sulfida (H₂S). Hättenschwiler in sod. (1997) poročajo, da poleg CO₂ geološkega izvora, izhaja iz tal tudi H₂S, čeprav so bile te koncentracije le malo nad mejo detekcije (Hättenschwiler in sod., 1997).

Na podlagi analize sestave združb AM gliv iz štirih neodvisnih območij mofet; travniških mofet v okolici Stavešincev, gozdnih mofet na Stavešinskem vrhu, čeških mofet v okolici Cheba in italijanskih mofet Bossoleto, lahko torej prav tako zaključimo, da je sestava združbe AM gliv primarno odvisna od determinističnih procesov vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv. V nasprotju z ordinacijo CCA za travniške mofete v okolici Stavešincev (slika 18), kjer je največ variabilnosti znotraj združb AM gliv pojasnil pH ($R^2 = 0,94$), je na večji prostorski skali s podatki iz vseh mofet, obravnavanimi v eni ordinaciji (slika 19), najmočnejši kazalec sprememb v sestavi združb AM gliv koncentracija CO₂ ($R^2 = 0,98$), sledjo mu koncentracija O₂ ($R^2 = 0,91$), vrednost pH v tleh ($R^2 = 0,86$), skupni dušik ($R^2 = 0,89$) in razpoložljivi fosfor ($R^2 = 0,60$).

5.1.3 Alfa diverzitetna AM gliv na območjih mofet

Na območjih z visoko koncentracijo CO₂ smo opazili statistično značilno manjšo diverzitetno taksonov AM gliv v primerjavi s kontrolnimi območji. To velja tako za pestrost taksonov kot za izenačenost in dominantnost taksonov AM gliv, torej parametre izračunane s Hillovimi števili 0 (pestrost vrst), 2 (izenačenost vrst) in ∞ (dominanca vrst) (slika 20). Opazili smo tudi, da je bila v avgustu 2010 in 2011 ter v oktobru 2011 pri vseh treh Hillovih številih dosežena največja diverzitetna taksonov AM gliv s kontrolnih območij ter najmanjša diverzitetna taksonov AM gliv z območij, z visoko koncentracijo CO₂. Ta je bila v večini omenjenih mesecev tudi statistično značilno manjša od diverzitetne taksonov AM gliv s kontrolnega območja. Statistično značilnih razlik v izenačenosti in dominanci taksonov AM gliv (Hillovo število 2 in ∞) med različnimi meseci in leti vzorčenja nismo opazili. Pestrost taksonov AM gliv (Hillovo število 0) se je značilno razlikovala med območji z različno koncentracijo CO₂ in med leti vzorčenja (slika 20). Maček in sod. (2011), ki so na območju travniških mofet v okolici Stavešincev raziskovali vpliv hipoksije

na sestavo združb AM gliv, poročajo o statistično značilno manjši diverziteti taksonov AM gliv (diverzitetna indeksa Shannon-Wiener in Simpson) na območjih z visoko koncentracijo CO₂ v primerjavi s kontrolnimi območji. V naši raziskavi smo na območjih z visoko koncentracijo CO₂ opazili statistično značilno manjšo pestrost taksonov ter manjšo izenačenost in dominantnost taksonov AM gliv v primerjavi s kontrolnimi območji, kar potrjuje rezultate opisane v Maček in sod. (2011).

Maček in sod. (2011) so prvi raziskovali vpliv hipoksije na strukturo združb AM gliv z območja travniških mofet v okolici Stavešincev, ki je bilo vključeno tudi v študijo te doktorske disertacije. V raziskavi so Maček in sod. (2011) obravnavali 403 sekvence AM gliv, ki so bile pridobljene s klasičnim postopkom – z metodo kloniranja in sekvenciranja po Sangerjevi metodi. V svoji študiji opisujejo prisotnost dveh pogostih filotipov, poimenovanih Glo85 in Glo86, ki so ju našli izključno na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Omenjena filotipa Glo85 in Glo86 sta v času njihove raziskave veljala kot potencialna specialista območij z visoko koncentracijo CO₂, saj sta bila detektirana samo na območjih z visoko koncentracijo CO₂. Razvoj novih metod pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche) nam je omogočil, da iz vzorca v krajšem času dobimo večje število sekvenc v primerjavi s klasičnimi postopki. Obenem lahko obdelamo večje število vzorcev, kar močno poveča resolucijo raziskav v naravnih okoljih. Z uporabo pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche) smo na območju travniških mofet analizirali 25.658 sekvenc, medtem ko so v študiji Maček in sod. (2011) z uporabo klasičnega pristopa, ki vključuje kloniranje in sekvenciranje po Sangerju, uspešno analizirali 403 sekvence. V naši študiji smo zato lahko preverili, ali so v večjem setu sekvenc med 25.685 analiziranimi sekvencami tudi tiste, ki so vsaj 97 % podobne sekvencam, ki pripadajo filotipoma Glo85 in Glo86 (Maček in sod. 2011), ter so, sicer redke, vendar prisotne tudi na kontrolnih območjih. Ugotovili smo, da sta Glo85 in Glo86 najbolj podobna dvema taksonoma iz naše študije (MOTU5 in MOTU22, slika 23). Iz slike 22 je razvidno, da vsebujeta MOTU5 in MOTU22 večji delež sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ kot s kontrolnih območij. To lahko opazimo tako v vzorcih iz leta 2010 kot v vzorcih iz leta 2011. Z uporabo novih molekularskih metod, tj. pirosekvenciranjem (454 GS-FLX, Roche), smo ugotovili (slika 22 in slika 23), da MOTU5 in MOTU22 vsebujeta tudi sekvence s kontrolnih območij, čeprav so le-te prisotne v manjšem številu.

V študiji te doktorske disertacije smo potrdili, da sta filotipa Glo85 in Glo86, ki sta najbolj podobna MOTU5 in MOTU22 iz naše študije (slika 23), najbolj abundantna na območjih z visoko koncentracijo CO₂, vendar se v manjšem številu sekvenc pojavljata tudi v kontrolnih tleh. Prisotnost omenjenih taksonov smo zabeležili tako v letu 2010 kot v letu 2011 (slika 21, slika 22 in slika 23). Na ta način smo dodatno dokazali, da sta sestava okoljskih združb AM gliv in abundanca posameznega MOTU v združbi primarno pogojeni z okoljskimi parametri tal. Znano je, da so tla prostorsko variabilno okolje (Quinton in sod., 2010), kjer je veliko talnih organizmov lokalno redkih, ker uspevajo na robu svoje ekološke niše. Ko se razmere spremenijo, se lahko poveča tudi abundanca in dominanca

takih taksonov (npr. Dumbrell in sod., 2011). Zaradi izhajanja geološkega plina se spremenijo kompeticijska razmerja med različnimi taksoni znotraj prisotne združbe in zato v združbi z območij visokih koncentracij CO₂ prevladajo ekološki specialisti, ki uspejo preiti te abiotske filtre. Med slednjimi so lahko bolj ali manj sorodni taksoni. Med bolj sorodnimi je kompeticija večja kot med manj sorodnimi, kar vpliva na izginevanje manj kompetitivnih vrst kljub njihovi potencialni ekološki primernosti za preživetje v danih ekstremnih razmerah.

Potrditve prisotnosti Glo85 in Glo86, tj. njima najbolj podobnih taksonov MOTU5 in MOTU22, tudi po 3 letih (torej ob vzorčenju v letih 2010 in 2011; Maček in sod., 2011 je izvajala vzorčenje v letu 2007) kaže na stabilnost združb AM gliv na območjih z visoko koncentracijo CO₂ (slika 21 in slika 22), ki je posledica dolgotrajne abiotske selekcije. Zanimivo je, da se na kontrolnih območjih med letoma 2010 in 2011 vrstni red abundance najbolj abundantnih MOTU, tj. MOTU3, MOTU31 in MOTU0, ni spremenil, medtem ko se je v združbi AM gliv z območij visoke koncentracije CO₂ vrstni red v abundanci najbolj abundantnih MOTU spremenil (slika 21). Združba AM gliv s kontrolnega območja, ki ni izpostavljena dolgotrajni abiotski selekciji, je tako bolj izenačena, kar potrjuje tudi diverzitetna, vrednotena s Hillovim številom 2 (slika 20). Diverzitetni indeksi kažejo tudi, da je združba AM gliv s kontrolnih območij bolj dominantna od združbe AM gliv z območij z visoko koncentracijo CO₂, kar smo opazili pri diverziteti, vrednoteni s Hillovim številom ∞ (slika 20) in pri vizualni analizi proporcionalne porazdelitve abundance (slika 21). Najbolj abundantna MOTU kontrolnih območij (MOTU3 in MOTU31; slika 21) vsebujeta skupaj kar 62 % vseh sekvenc s kontrolnih območij, oziroma 40 % vseh analiziranih sekvenc. V primerjavi s tem, vsebujeta najbolj abundantna MOTU z območij z visoko koncentracijo CO₂ 82 % vseh sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ oziroma 40 % vseh analiziranih sekvenc. Združbe AM gliv imajo med leti podobno sestavo (slika 22), s poudarkom, da so se MOTU z največjim številom sekvenc premaknili v vrstnem redu dominance (slika 21), kar potrjuje stohastično naravo sestave združb AM gliv med različnimi leti. Na začetku vegetacijskega obdobja je AM glivam na voljo vedno večja količina rastlinskih fotoasimilatov, ki omogočajo hitro rast določenim taksonom AM gliv, torej tistim, ki prvi dobijo večji dotok teh asimilatov, kar pa je lahko znotraj združbe AM gliv precej naključno (največ dobi tisti, ki je ob pravem času na pravem mestu). Ta stohastična narava AM gliv se pogosto kaže tudi v dominanci posameznih taksonov AM gliv (Dumbrell in sod., 2010b).

5.1.4 Filogenetska sestava združb AM gliv na območjih mofet

Na podlagi analize filogenetske sestave združb AM gliv (internetna baza raziskav diverzitetne arbuskularnih mikoriznih gliv; MaarjAM, <http://maarjam.botany.ut.ee>, Öpik in sod., 2010), vzorčenih z območja travniških mofet v okolici Stavešincev, lahko sekvence AM gliv razdelimo v 6 skupin, *Archaeosporaceae*, skupina *Glomus* B, *Acualosporaceae*,

Diversisporaceae, *Gigasporaceae* in *Glomeraceae* (slika 23 in preglednica 16). Z izjemo skupin *Glomus* B in *Diversisporaceae*, kjer je bilo več sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂, je bilo pri ostalih skupinah več sekvenc s kontrolnih območij (slika 23 in preglednica 16). Največ sekvenc (25.287; 98,5 %) je znotraj družine *Glomeraceae*, kjer je 8.949 (35,4 %) sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ in 16.338 (64,6 %) sekvenc s kontrolnih območij. V to družino spadajo tudi MOTU, ki imajo največje število sekvenc (slika 23). Najbolj abundantni MOTU, kjer je največje število sekvenc s kontrolnih območij, so MOTU3, MOTU31 in MOTU0, najbolj abundantni MOTU, kjer je največje število sekvenc z območij z visokim CO₂, pa so MOTU5 in MOTU22. MOTU3 se po bazi MaarjAM (Öpik in sod., 2010) najbolj približa virtualnemu taksonu VTX00115, znotraj katerega so tudi sekvence, izolirane iz združenih korenin prerijskih rastlin, vzorčenih v Kanadi, iz korenin pionirskih in nepionirskih rastlin iz Tibeta ter z območja neokrnjenega tropskega gorskega pragozda v Ekvadorju (povzeto po bazi MaarjAM; Öpik in sod., 2010). Naslednji najbolj abundanten MOTU je MOTU31, s pripadajočim virtualnim taksonom VTX00219, kjer so bile sekvence izolirane iz korenin vinske trte, vrst trav, ki dobro uspevajo na serpentinah, korenin dreves iz mešanega gozda in gozda iglavcev v Etiopiji (povzeto po bazi MaarjAM; Öpik in sod., 2010). Tretji najbolj abundanten MOTU, ki ima največ sekvenc s kontrolnih območij, je MOTU0, ki je najbolj podoben virtualnemu taksonu VTX00172. Sekvence, ki pripadajo temu virtualnemu taksonu, so bile izolirane iz korenin dreves bukovega gozda v Gruziji, macesnovega gozda v Rusiji in peščenih sukcesivnih tal v ZDA (povzeto po bazi MaarjAM; Öpik in sod., 2010). Najbolj abundantna MOTU, kjer je največ sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂, sta MOTU5 in MOTU22, oba najbolj podobna VTX00309, kjer so bile sekvence izolirane iz korenin vinske trte in listopadnega gozda na Kitajskem (povzeto po bazi MaarjAM; Öpik in sod., 2010). Če povzamemo, bi lahko rekli, da so bile sekvence najbolj podobne našim, izolirane večinoma iz korenin gozdnih dreves, kar bi lahko bilo povezano z nižjo pH vrednostjo v gozdovih, obenem pa je bilo veliko študij molekularne ekologije AM gliv z uporabo genskih markerjev za SSU rRNK (vključno z uporabo pirosekvenciranja) izvedenih prav v gozdnih habitatih (npr. Helgason in sod., 2002; Öpik in sod., 2003; Öpik in sod., 2008; Öpik in sod., 2009). V bazi MaarjAM (Öpik in sod., 2010), s katero smo naše podatke primerjali, je veliko sekvenc prav iz teh habitatov, kar lahko vsaj delno pojasni opaženi vzorec.

Ugotovili smo, da so bili vsi MOTU iz naše raziskave že detektirani drugje, tako da o novih MOTU AM gliv z območja travniških mofet ne poročamo. O majhnem številu novih MOTU poročajo Öpik in sod. (2009) in Dumbrell in sod. (2011). V obeh študijah poročajo, da so reprezentativne sekvence MOTU, v veliki večini primerov, že bile objavljene z drugih območij. S klasičnimi molekulskimi metodami (kloniranje in sekvenciranje po Sangerju) nekateri MOTU zaradi majhne abundance niso bili detektirani, vendar sedaj nove generacije sekvenciranja hitro povečujejo število sekvenc v bazah (npr. MaarjAM; Öpik in sod., 2010). Z večanjem števila sekvenc v bazah (MaarjAM; Öpik in sod., 2010)

pa hitro narašča tudi odkrita diverziteti AM gliv (na podlagi okoljskih sekvenc). To je tudi glavni razlog, zakaj so bili tako naši MOTU, kot večina MOTU drugih raziskav (Öpik in sod., 2009; Dumbrell in sod., 2011), že detektirani na drugih območjih.

5.2 ARHEJE IN BAKTERIJE

5.2.1 Vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb arhej in bakterij

Doktorska disertacija in nedavno objavljen članek Šibanc in sod. (2014) v reviji *Soil Biology and Biochemistry* predstavljata prvi opis združb arhej in bakterij na območjih mofet z uporabo analize sekvenc klonskih knjižnic. Naši rezultati kažejo na prisotnost različnih združb arhej in bakterij v tleh z različno koncentracijo CO₂ v talnem zraku, vzorčenih iz tal travniških mofet v okolici Stavešincev. Ti rezultati potrjujejo, da specifični abiotski dejavniki okolja močno pogojujejo sestavo združb arhej in bakterij na območju mofet. Ugotovitev je bila potrjena tako z različnimi molekulskimi metodami (sekvenciranje markerjev 16S rRNK in analiza T-RFLP) kot tudi z nadaljnjimi analizami sestave združb, prikazanimi v ordinacijskih grafih (slika 28).

Območja z visoko koncentracijo CO₂ imajo statistično različno sestavo združb arhej in bakterij v primerjavi z območji s srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji. Dolgotrajni abiotski selekcijski pritisk vodi do sprememb v sestavi mikrobnih združb, kar je bilo že dokazano na primeru opisov sestave združb arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev (opisano v poglavjih 4.2 in 5.1 ter v Maček in sod., 2011) ter na primeru opisa mikrobnih združb v tleh iz drugih naravnih izvirov CO₂ (npr. Oppermann in sod., 2010; Krüger in sod., 2011; Frerichs in sod., 2013). Kljub temu pa še ni pojasnjeno, ali na mikrobo v tleh vpliva neposredno CO₂ ali pa se mikroorganizmi posredno odzivajo na spremljajoče dejavnike, kot npr. lokalno inducirano hipoksijo ali povišan pH. Večja koncentracija geološkega CO₂ na mofetah vedno sovпада s talno hipoksijo. Ker je raven O₂ eden glavnih abiotskih dejavnikov, ki vplivajo na vse žive organizme, smo sklepali, da je ravno koncentracija O₂, in ne neposredna izpostavljenost visoki koncentraciji CO₂, glavni dejavnik, ki pogojuje sestavo mikrobnih združb arhej in bakterij na območjih mofet (Maček in sod., 2011). Rezultati kažejo na lokalizirano hipoksično stanje na območjih z najvišjo koncentracijo CO₂, ne pa tudi v manj oz. neizpostavljenih tleh. V tleh, izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂ geološkega izvora (> 86 % CO₂), smo zabeležili samo 4 % O₂, medtem ko smo v tleh, izpostavljenim srednjim koncentracijam CO₂ (14 % CO₂), zabeležili > 19 % O₂, kar je primerljivo z 21 % O₂ v kontrolnih tleh. Koncentracije O₂ v tleh s srednjo in kontrolno koncentracijo CO₂ omogočajo aerobno dihanje organizmov, ki živijo na teh območjih, vendar še vedno obstaja možnost pojava mikrookolij s hipoksičnim ali celo anoksičnim stanjem znotraj območja mofet tudi tam, kjer koncentracija CO₂ ni ekstremno visoka. Obratno pa v tleh,

izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂, prevladuje skoraj v celoti hipoksično oz. anoksično stanje (Vodnik in sod., 2009; Maček in sod., 2011, 2012).

Podobnost v koncentracijah O₂ med območji s srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji, ki sta v obeh primerih bistveno drugačni od hipoksičnega stanja v tleh z visoko koncentracijo CO₂, se odraža v različnih sestavah mikrobnih združb. Tako v primeru arhej kot tudi v primeru bakterij je bila sestava združb na območju srednje koncentracije CO₂ in kontrolnega območja podobna, kar so pokazale vse analize: analiza T-RFLP profilov (slika 24 in slika 25), filogenetska sestava (preglednica 17 in preglednica 18) in ordinacijska analiza (slika 28). Nasprotno pa so bile v tleh, izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂, združbe arhej in bakterij statistično značilno različne od združb na ostalih dveh območjih. Razpoložljivost O₂ je najmočnejši kazalec sprememb v sestavi združb arhej in bakterij na območjih mofet ($R^2 > 0,96$, slika 28), kar pomeni, da so abiotski dejavniki (koncentracija O₂ in CO₂) v tleh glavno gonilo sestave mikrobnih združb. To je pokazala tudi ordinacija NMDS (slika 28). Koncentracija CO₂ v tleh je bila močno pozitivno povezana z razpoložljivim fosforjem v tleh ter negativno povezana s skupnim dušikom in vrednostjo pH v tleh (slika 28 in preglednica 13). Spremembe slednjega so povezane z raztapljanjem geološkega CO₂ v vodi in posledično s tvorbo ogljikove kisline. Z izjemo vsebnosti razpoložljivega fosforja v tleh zgoraj omenjene talne lastnosti niso bile bistveno različne med območji z visoko koncentracijo CO₂ in območji s srednjo koncentracijo CO₂ ter kontrolnimi območji, kar jih uvršča med sekundarne regulatorje sestave mikrobnih združb. Skupni dušik in pH tal sta se izkazala za pomembna dejavnika pri ločevanju sestave združb arhej v tleh, izpostavljenih srednji koncentraciji CO₂, od tistih v kontrolnih tleh, česar nismo opazili pri bakterijah (slika 28). Verjetno spodbujajo podobni ekološki mehanizmi tudi v tej študiji ugotovljene spremembe na nivoju združbe, kar bi potrdila identifikacija taksonov, za katere je znano, da so prilagojeni na talna okolja z nizko koncentracijo O₂ in visoko koncentracijo CO₂.

5.2.2 Alfa diverziteteta združb arhej in bakterij na območjih mofet

Mikrobna diverziteteta se ni razlikovala med območji z različno koncentracijo CO₂, čeprav je bila sestava združb arhej bistveno bolj izenačena v tleh, izpostavljenih visokim koncentracijam CO₂. Analiza krivulj redčenja MOTU (sliki 26 in 27) je kljub temu pokazala potencialne razlike med območji z različnim režimom CO₂, tako za združbo arhej kot za združbo bakterij. Krivulja redčenja MOTU se je pri združbah bakterij (slika 27) v tleh z visoko koncentracijo CO₂ že skoraj približala asimptoti, medtem ko je v kontrolnih tleh krivulja še vedno naraščala. Ravno obraten pojav smo opazili pri arhejah (slika 26). Intenzivnejše vzorčenje bi torej lahko privedlo do zaznave večjih razlik med diverziteteto arhej in bakterij v tleh, izpostavljenih visokim koncentracijam CO₂, v primerjavi s kontrolnimi tlemi. V tleh je veliko lokalno redkih talnih organizmov, ki se jim poveča

abundanca, ko se razmere v okolici njihove niše spremenijo (Dumbrell in sod., 2011). Pestrost taksonov (kot tudi izenačenost in dominanca taksonov) arhej narašča s povečanjem koncentracije CO₂ v tleh (slika 26 in slika 29), kar nakazuje, da predstavlja območje s povečano koncentracijo CO₂ preferenčno nišo arhej na območju travniških mofet. Nasprotno bi lahko rekli za bakterije, kjer predstavljajo kontrolna območja na travniških mofetah njihovo preferenčno območje, saj se pestrost taksonov bakterij zmanjšuje s povečanjem koncentracije CO₂ v tleh (slika 27 in slika 29). V tem primeru bi v različnih okoljih opazili po sestavi različne združbe, ki bi vključevale lokalno sicer redke taksone, ki pa bi lahko, ob optimalnih razmerah v svoji niši, tudi lokalno dominirali (Dumbrell in sod., 2011; Maček in sod., 2011). Podobno smo pri vzorcih sestave mikrobnih združb opazili v naši študiji.

5.2.3 Filogenija združb arhej in bakterij na območjih mofet

Analiza filogenetske sestave združb arhej in bakterij, vzorčenih na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, je pokazala spremembo v sestavi združb arhej in bakterij v smeri večjega števila anaerobnih in metanogenih taksonov. Opazili smo statistično značilno večje število sekvenc z območja z visoko koncentracijo CO₂ v razredu arhej *Methanomicrobia* in v razredih bakterij *Chloroflexi* in *Firmicutes*. Slednja pogosto vsebujeta anaerobne predstavnike (preglednici 17 in 18 ter sliki 30 in 31).

5.2.3.1 Arheje

Dosedanje raziskave na območjih mofet so pokazale več anaerobnih in acidofilnih skupin mikrobov v tleh z visoko koncentracijo CO₂ (Krüger in sod., 2009a, 2011; Oppermann in sod., 2010; Frerichs in sod., 2013). Kljub temu je večina študij le posredno opisovala spremembe v sestavi združb talnih mikrobov, saj niso izvedli molekulske karakterizacije mikrobnih taksonov. Izjema je pred kratkim objavljena študija (Frerichs in sod., 2013), v kateri so avtorji uporabili poliakrilamidno elektroforezo z gradientom denaturanta (DGGE) za prepoznavanje sprememb v sestavi združb arhej in bakterij v tleh s povečano koncentracijo CO₂ geološkega izvora in v kontrolnih tleh na območju naravnega izvira CO₂ v bližini Laacher See v Nemčiji. Analiza združb arhej, ki so jo izvedli v tej študiji, je pokazala razlike v sestavi združbe vzdolž gradienta naraščajoče koncentracije CO₂, pri čemer so v neposredni bližini izvirov CO₂ prevladovali taksoni iz skupin *Crenarchaeota* in *Thaumarchaeota*. Pojavljanje večjega števila taksonov iz debla *Thaumarchaeota* so avtorji tudi opredelili kot potencialni bioindikator prisotnosti CO₂ geološkega izvora v tleh. Naše ugotovitve podpirajo ta predlog, saj smo na območju travniških mofet našli predstavnike iz debla *Thaumarchaeota* izključno v tleh s srednjo in visoko koncentracijo CO₂ (preglednica 17), kar bi lahko povezali z zakisovanjem tal zaradi prisotnosti CO₂ in z obligatno acidofilnostjo predstavnikov omenjene skupine arhej (Lehtovirta - Morley in sod., 2011).

V nasprotju s poročanjem Frerichs in sod. (2013) je naša študija pokazala bistveno večjo prisotnost metanogenih predstavnikov debela *Methanomicrobia* in večjo abundanco anaerobnih bakterijskih taksonov v površinskem sloju tal, izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂. Združbo arhej (preglednica 17, slika 30) na našem območju sestavljata večinoma razreda *Thermoprotei* in *Methanomicrobia*, od katerih so predstavniki slednjega bistveno bolj pogosti v tleh, ki so izpostavljena visoki koncentraciji CO₂, kot pa v kontrolnih tleh. Predstavniki metanogenega razreda *Methanomicrobia* spadajo med striktne anaerobne predstavnike *Euryarchaeota*, katerih presnova je omejena na pretvorbo CO₂ in H₂ v metan (Thauer in sod., 2008). Tla, bogata s CO₂, v mofetah zato predstavljajo njihov potencialni habitat, kar je v skladu z ugotovitvami Beaubien in sod. (2008), ki so na podlagi produkcije in oksidacije CH₄ dokazali največjo aktivnost striktnih anaerobov, tj. metanogenih arhej, v tleh izpostavljenih visokim koncentracijam CO₂. Ugotovitve so kasneje podprli rezultati analize lipidnih biomarkerjev (Opperman in sod., 2010), ki so poleg dokazovanja prisotnosti drugih taksonov izpostavili prisotnost metanogenih arhej v tleh, izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂. Premik proti združbam, kjer v razmerah visoke koncentracije CO₂ v tleh prevladuje razred *Methanomicrobia*, ima funkcionalne posledice povezane s povečano proizvodnjo CH₄. V naši študiji smo zasledili sledove CH₄ ravno v tleh, izpostavljenih visokim koncentracijam CO₂, ne pa tudi na drugih vzorčnih lokacijah (priloga A).

5.2.3.2 Bakterije

Podobno kot pri arhejah se je tudi združba bakterij premaknila v smer, kjer prevladujejo anaerobi, kar še dodatno potrjuje ugotovitev, da je hipoksično stanje v tleh glavni dejavnik, ki vpliva na razlike v sestavi mikrobnih združb na območjih mofet. Vseh 13 bakterijskih debel iz naše študije (preglednica 18, slika 31), med katerimi imata ponavadi debli *Acidobacteria* in *Proteobacteria* največjo abundanco sekvenc, se pogosto pojavlja v talnem habitatu (npr. Janssen, 2006). Razred *Deltaproteobacteria* je edini, ki je bil statistično značilno številčnejši v kontrolnih tleh, v primerjavi s tlemi, izpostavljenimi visoki koncentraciji CO₂. Predstavniki te skupine so zato verjetno občutljivi na hipoksijo tal. Tudi drugi avtorji poročajo o manjši abundanci predstavnikov družine *Geobacteraceae* v tleh, izpostavljenih visokim koncentracijam CO₂ (Oppermann in sod., 2010; Frerichs in sod., 2013). Sekvence anaerobnih predstavnikov debela *Chloroflexi* (poleg sekvenc debela *Firmicutes*) so bile najbolj pogoste v tleh, izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂. Deblo *Chloroflexi* je povezano z dvema razredoma, in sicer z razredom *Anaerolineae*, ki uspeva v strogo anaerobnih razmerah, ter katerega prisotnost so potrdili v anaerobnem blatu (Yamada in sod., 2006), ter z aerobnimi *Ktedonobacteria*, ki uspevajo v mikroaerofilnih okoljih (Chang in sod., 2011). Zanimivo je, da so Frerich in sod. (2013) v svoji študiji opazili večji delež anaerobnih taksonov v globljih plasteh tal na območju mofet v okolici Laacher See, Nemčija (do globine 60 cm), s primerljivo koncentracijo CO₂ v tleh, kot je na

območju z visokim CO₂ travniških mofet v okolici Stavešincev, ne pa tudi na površini, kjer je delež CO₂ dosegal le 30 %. Poleg tega v številnih študijah, (npr. Oppermann in sod., 2010; Krüger in sod., 2011; Frerichs in sod., 2013), izvedenih na območjih mofet, poročajo tudi o večji aktivnosti in povečani prisotnosti sulfat reducirajočih bakterij, česar pa nismo opazili v naši študiji. V nasprotju z izviri CO₂ v Italiji (npr. Raschi in sod., 1997; Oppermann in sod., 2010) in v Nemčiji (npr. Krüger in sod., 2011; Frerichs in sod., 2013) so travniške mofete v okolici Stavešincev znane po tem, da so večinoma proste žvepljenih spojin (Pfanz in sod., 2007) ter da so koncentracije H₂S pod mejo detekcije (vrednosti meritev so podane v prilogi A). V nasprotju s predhodnimi raziskavami (Krüger in sod., 2009a, 2011; Oppermann in sod., 2010) v naši študiji nismo opazili porasta števila acidofilnih bakterij v tleh, izpostavljenih visoki koncentraciji CO₂, kar se verjetno odraža v podobni pH vrednosti med tlemi s srednjo in visoko koncentracijo CO₂, ter v relativno kisli reakciji v kontrolnih tleh.

5.3 KVASOVKE

Iz tal območja travniških mofet v okolici Stavešincev smo uspešno identificirali 8 vrst kvasovk, med katerimi je bila tudi kvasovka *Occultifur species sp. nov.*, ki je, kot kaže, do sedaj še neopisana vrsta kvasovke. Izvedli smo teste sposobnosti rasti kvasovk za rast v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ ter testirali njihovo sposobnost fermentacije glukoze. Pri izolatu kvasovke *Occultifur species sp. nov.* smo izvedli dodatne biokemijske teste, da bi lahko potrdili, ali gre res za novo, do sedaj še neopisano vrsto kvasovke.

5.3.1 Sposobnost preživetja kvasovk v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ in fermentacija glukoze

Iz tal z območij z visoko koncentracijo CO₂ smo izolirali dve vrsti kvasovk: *Occultifur species sp. nov.* in *Wickerhamomyces anomalus*, iz kontrolnih območij pet vrst kvasovk: *Candida sake*, *Candida vartiovaarae*, *Debaryomyces pseudopolymorphus*, *Ustilago davisii* in *Williopsis saturnus* ter z obeh omenjenih območij eno vrsto, *Rhodotorula glutinis* (preglednica 19). Na izolatih smo nato preverili sposobnost rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ ter preverili njihovo sposobnost fermentacije glukoze. Z željo, da preverimo, ali obstaja povezava med sposobnostjo fermentacije glukoze in sposobnostjo rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂, smo slednjo preverili tudi na izolatih izbranih fakultativno anaerobnih vrst kvasovk iz Zbirke ekstremofilnih kvasovk - EXF (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, UL). Pri kvasovki *Occultifur species sp. nov.* smo izvedli še dodatne biokemijske teste, saj je njena identifikacija z iskalnim algoritmom BLAST imela najslabšo podobnost z njej najbližjimi filogenetskimi sorodniki (98 % podobnost s kvasovko *Occultifur externus*).

Analiza biodiverzitete kvasovk z območja travniških mofet v okolici Stavešincev je pokazala, da ena od treh vrst kvasovk, ki smo jih izolirali z območja s povečano koncentracijo CO₂ v tleh, ni sposobna rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ (preglednica 19). Prav tako je analiza pokazala, da so 4 od 6 vrst kvasovk, izolirane s kontrolnih območij, sposobne rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ (preglednica 19). Povezavo pa lahko najdemo med sposobnostjo rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ ter sposobnostjo fermentacije glukoze (preglednica 19 in preglednica 20). Rezultati so pokazali, da so kvasovke, ki smo jih izolirali z območja travniških mofet v okolici Stavešincev in so sposobne rasti tudi v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂, sposobne tudi fermentacije glukoze (preglednica 19). Test smo ponovili tudi pri izbranih fakultativno anaerobnih kvasovkah iz zbirke ekstremofilnih gliv (EXF), Biotehniške fakultete, Oddelka za biologijo (preglednica 23), kar je potrdilo naše rezultate o potencialni povezavi med sposobnostjo fermentacije D-glukoze in sposobnostjo rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂. Čeprav je sposobnost kvasovk, da fermentirajo glukozo pod omejenimi viri kisika, pogosta lastnost kvasovk, se izkaže, da rast v anaerobnih razmerah ni pogosto opažena (Visser in sod., 1990). Rezultati naše študije so pokazali, da temu ni tako, saj smo opazili, da kvasovke, ki fermentirajo glukozo, tudi rastejo v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂ in posledično zmanjšano koncentracijo O₂. Visser in sod. (1990) poročajo, da je le nekaj vrst fakultativno anaerobnih kvasovk sposobnih hitre rasti pri omejenem viru kisika, medtem ko smo v naši raziskavi opazili, da je izmed 23 različnih vrst fakultativno anaerobnih kvasovk, večina, torej 16 vrst, sposobna rasti pri atmosferi s povečano koncentracijo CO₂.

5.3.2 Filogenija kvasovk

Analiza filogenetske sestave izoliranih kvasovk z območja travniških mofet v okolici Stavešincev je pokazala, da je kvasovka *Wickerhamomyces anomalus* edina, ki je bila izolirana izključno z območja z visoko koncentracijo CO₂, sposobna tudi fermentirati glukozo in rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂. Kvasovka *W. anomalus* je bila sicer v drugih raziskavah izolirana tudi iz cvetočih rastlin, površine sadja, črevesa žuželk, človeških tkiv in izločkov, mlečnih in pekovskih izdelkov, odpadnih voda, drevesnih izločkov, slane hrane in morskega okolja (Walker, 2011). Ustrezajo ji temperature med 3 do 37 °C, ter pH med 2 in 12, zaradi česar je v naravi zelo pogosta (Walker, 2011). Je fakultativno anaerobna kvasovka, ki lahko raste v okolju s kisikom ter v okolju z omejenim kisikom. V aerobnih razmerah je pogostejša respiratorna rast, medtem ko se alkoholna fermentacija pojavi le z omejitvijo kisika (Walker, 2011). Omenjeno kaže na lastnosti Pasteurjevega učinka in odsotnost Crabtreejevega učinka (za podroben opis posameznih učinkov glej poglavje 2.2.3) pri tej kvasovki (povzeto po Walker, 2011). Pasteurjev učinek pomeni, da pri visokih koncentracijah glukoze *W. anomalus* diha v aerobnih razmerah, če pa kvasovko prenesemo v okolje z manjšo količino razpoložljivega kisika, se bo njena

presnova spremenila v fermentativno (Fredlund in sod., 2004). Na območjih z visoko koncentracijo CO₂ na travniških mofetah v okolici Stavešincev se ob pojavljanju visoke koncentracije CO₂ inducira hipoksija, na nekaterih mestih celo anoksija (Maček in sod., 2011). Območja naravnih izvirov CO₂ zaradi povečevanja koncentracije CO₂ in s tem povezanega manjšanja koncentracije O₂ predstavljajo potencialni naravni habitat fermentativnih kvasovk.

Na kontrolnem območju travniških mofet v okolici Stavešincev sta bili najbolj abundantni kvasovki *Candida sake* in *Williopsis saturnus*, ki sta bili sposobni rasti tudi v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂. Kvasovka *Candida sake* je v literaturi največkrat omenjena kot biokontrolni organizem za zatiranje skladiščnih patogenov (modre plesni) na jabolkah (npr. Usall in sod., 2000). Kvasovka *Williopsis saturnus* je poznana po sposobnosti inhibicije kvasovk, ki povzročajo kvarjenje hrane, ter po protimikrobnih sposobnostih (npr. Guyard in sod., 2002), ima pa tudi vlogo pri fermentaciji vina (Erten in Tangler, 2010). Prav sposobnost fermentacije je razlog, da je kvasovka *Williopsis saturnus* sposobna rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂, kar je značilnost območja travniških mofet v okolici Stavešincev.

Vsi štirje izolati kvasovke *Occultifur species sp. nov.* so imeli najslabšo identifikacijo po iskalnem algoritmu BLAST z najbližjimi filogenetskimi sorodniki. Pri izolatih kvasovke *Occultifur species sp. nov.* smo naredili dodatne biokemijske teste, da bi potrdili, ali gre res za novo vrsto. Primerjali smo rezultate asimilacijskih testov med izolati kvasovk z območja travniških mofet v okolici Stavešincev s po literaturi (Sampaio in sod., 1999) zabeleženimi podatki o asimilaciji različnih virov ogljika izolatov kvasovke *Occultifur externus* (Sampaio in sod., 1999), izolirane iz listnega opada na Portugalskem. Nobena od omenjenih kvasovk ni sposobna fermentirati glukoze, ne tvorijo škroba, test ureaze je bil pozitiven za vse. Razlike v asimilaciji sladkorjev so se pokazale pri D-galaktozi, L-sorbozi, D-glukozaminu, celobiozi, laktozi, rafinozi in ribitolu. Izolirani štirje sevi izolata *Occultifur species sp. nov.* se med seboj niso parili, kar je bilo razvidno iz odsotnosti hif. Iz omenjenih podatkov, predvsem iz razlike v asimilaciji različnih virov ogljika (preglednica 20 in preglednica 23) in iz analize filogenetskega drevesa (slika 32), lahko povzamemo, da je kvasovka *Occultifur species sp. nov.* res nova, do sedaj še neopisana vrsta kvasovke.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov raziskav biodiverzitete in sestave združb izbranih skupin talnih mikroorganizmov na različnih območjih naravnih izvirov CO₂ oz. mofet v okviru te doktorske disertacije lahko sklepamo naslednje:

1. Korenine rastlin, ki rastejo na območju travniških mofet v okolici Stavešincev, so kolonizirane z arbuskularnimi mikoriznimi (AM) glivami tudi na območjih z visoko koncentracijo geološkega CO₂. V raziskavah nismo ugotovili statistično značilne povezave med parametri kolonizacije korenin z AM glivami in koncentracijo CO₂ v tleh. V koreninah rastlin, vzorčenih na območjih z visoko koncentracijo CO₂, smo opazili prisotnost arbuskulov, kar kaže na fiziološko aktivno simbiozo in izmenjavo hranil med rastlinami in AM glivami.
2. Sestava združb AM gliv je statistično značilno različna med območji z visoko koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji (ANOVA; $P < 0,001$). Med različnimi talnimi parametri je največ variabilnosti v sestavi združb AM gliv z območja travniških mofet v okolici Stavešincev pojasnila vrednost pH tal ($R^2 = 0,96$), sledijo koncentracija CO₂ v tleh ($R^2 = 0,78$), koncentracija O₂ v tleh ($R^2 = 0,73$), vpliv vzorčenja v različnih letih ($R^2 = 0,48$), razpoložljivi fosfor ($R^2 = 0,46$) in skupni dušik ($R^2 = 0,43$). Nižanje vrednosti pH tal na območjih mofet je pogojeno s prisotnostjo geološkega CO₂. Združbe AM gliv z območij travniških mofet se razdelijo v dve statistično značilni skupini, prvo s kontrolnih območij in drugo z območij z visoko koncentracijo geološkega CO₂ v tleh. Naši rezultati so pokazali, da imajo na območju travniških mofet v okolici Stavešincev največji vpliv na variabilnost znotraj sestave združb AM gliv abiotski dejavniki okolja, predvsem vrednost pH tal, koncentraciji CO₂ in O₂ v tleh ($R^2 > 0,73$). Opazili smo tudi vpliv različnih let vzorčenja ($R^2 = 0,48$) na variabilnost znotraj sestave združb AM gliv, medtem ko razlik med različnimi meseci znotraj rastne sezone rastlin nismo opazili.
3. V analizo vpliva abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv na območjih mofet smo poleg travniških mofet v okolici Stavešincev vključili tudi gozdne mofete na Stavešinskem vrhu, češke mofete v okolici Cheba in italijanske mofete Bossoleto. Tudi v primeru geografsko oddaljenih mofet nam največ variabilnosti v sestavi združb AM gliv pojasni koncentracija CO₂ v tleh ($R^2 = 0,98$), sledi koncentracija O₂ ($R^2 = 0,91$) in pH tal ($R^2 = 0,86$).
4. Na kontrolnih lokacijah travniških mofet v okolici Stavešincev smo v združbi AM gliv ugotovili večjo biodiverziteto (glede na izračunana Hillova števila), ki se kaže v večji pestrosti MOTU (izračunani s Hillovim številom 0), večji izenačenosti MOTU (izračunani s Hillovim številom 2) in večji dominanci MOTU (izračunani s

- Hillovim številom ∞) v primerjavi z združbo z območij z visoko koncentracijo CO₂.
5. V naši raziskavi smo ponovno potrdili prisotnost dveh že opisanih specialistov AM gliv (Glo85 in Glo86, Maček in sod., 2011) na območju travniških mofet v okolici Stavešincev z zelo sorodnimi sekvencami (MOTU5 in MOTU22), kljub nekaj letnemu zamiku vzorčenja po študiji Maček in sod. (2011) in uporabi novih metodoloških pristopov (z uporabo novih molekulskih metod tj. pirosekvenciranja; 454 GS-FLX, Roche), kar kaže na kompatibilnost obeh metod in dolgoročno stabilnost sestave združb AM gliv na območju mofet.
 6. Rezultati naših analiz so pokazali, da MOTU5 in MOTU22 vsebujeta tudi sekvence AM gliv s kontrolnih območij, vendar so te v kontrolnih tleh redke. Na ta način smo dodatno dokazali, da sta sestava okoljskih združb AM gliv in abundanca posameznega MOTU v združbi primarno pogojeni z okoljskimi parametri tal. Obenem sta pogojeni z naborom taksonov, ki so na razpolago v ožji okolici, v našem primeru z združbo na območju kontrolnih koncentracij geološkega plina. Zaradi izhajanja geološkega plina se spremenijo kompeticijska razmerja med različnimi taksoni znotraj prisotne združbe in zato v združbi z območij visokih koncentracij CO₂ prevladajo ekološki specialisti, ki uspejo preiti te abiotske filtre. Med slednjimi so lahko bolj ali manj sorodni taksoni. Med bolj sorodnimi je kompeticija večja kot med manj sorodnimi, kar vpliva na izginevanje manj kompetitivnih vrst, kljub njihovi potencialni ekološki primernosti za preživetje v danih ekstremnih razmerah.
 7. Sestava združb arhej in bakterij se je med območji z visoko, srednjo in kontrolno koncentracijo CO₂ statistično značilno razlikovala. Največ variabilnosti v sestavi združb arhej oz. bakterij nam pojasni koncentracija CO₂ v tleh ($R^2 > 0,957$), razpoložljivi fosfor ($R^2 > 0,953$), koncentracija O₂ v tleh ($P < 0,01$; $R^2 > 0,962$), skupni dušik ($P < 0,05$; $R^2 > 0,790$) in v primeru arhej tudi pH tal ($R^2 > 0,583$). Koncentracija O₂ v tleh je glavni abiotski dejavnik, ki vpliva na razlike v sestavi združb arhej in bakterij med območji z visoko koncentracijo CO₂ in območji s srednjo in kontrolno koncentracijo CO₂, medtem ko imata količina skupnega dušika in vrednost pH tal glavno vlogo pri ločitvi združb arhej med območji s srednjo in kontrolno koncentracijo CO₂.
 8. Diverzitetna arhej in bakterij (določena s Hillovimi števili 0, 2 in ∞) ni bila statistično značilno povezana s koncentracijo CO₂ v tleh, prav tako se ni razlikovala med območji z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji.

9. V tleh travniških mofet v okolici Stavešincev, ki so izpostavljena visokim koncentracijam CO₂, je bilo v razredu arhej *Methanomicrobia* in deblih bakterij *Chloroflexi* in *Firmicutes* statistično značilno večje število sekvenc kot v kontrolnih tleh, medtem ko je bilo v razredih bakterij *Thermoplasmata* in *Deltaproteobacteria* statistično značilno večje število sekvenc na kontrolnih območjih v primerjavi z območji z visoko koncentracijo CO₂. Naši rezultati kažejo na spremembo v sestavi združb arhej in bakterij v smeri večjega števila anaerobnih in metanogenih predstavnikov v združbi arhej in bakterij na območjih visoke koncentracije CO₂ na območju travniških mofet v okolici Stavešincev.
10. Kvasovke, ki so sposobne fermentirati D-glukozo, so v veliki večini sposobne tudi rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂. Dokazali smo, da je znotraj anaerobnih območij, kamor do določene mere spadajo tudi območja travniških mofet v okolici Stavešincev, več vrst fermentativnih kvasovk, kot kvasovk, ki D-glukoze ne fermentirajo.
11. Kvasovka *Occultifur species sp. nov.*, izolirana iz tal z visoko koncentracijo CO₂ z območja travniških mofet v okolici Stavešincev, predstavlja novo, do sedaj še neopisano vrsto kvasovke, za katero je značilno, da kljub temu, da je bila izolirana iz tal z visoko koncentracijo CO₂, ne fermentira D-glukoze. Od doslej znanih sorodnih vrst se razlikuje v asimilaciji določenih sladkorjev (D-galaktozi, L-sorbozi, D-glukozaminu, celobiozi, laktozi, rafinozi in ribitolu) kot tudi filogenetsko, na podlagi primerjave sekvenc genov za veliko podenoto ribosoma (LSU).

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Raziskovanje procesov, ki vplivajo na diverzitetu združb različnih skupin organizmov, je že dolgo v središču ekoloških študij, saj ima razumevanje teh procesov pomembno vlogo pri napovedi odzivov ekosistemov na spremembe okolja. Kljub hitremu metodološkemu razvoju je razumevanje mehanizmov vpliva abiotskih dejavnikov okolja na strukturiranje združb talnih mikroorganizmov še vedno omejeno in potrebno nadaljnjih raziskav. Tovrstne raziskave so v naravnih ekosistemih težavne zaradi specifičnih lastnosti talnih ekosistemov, kjer so močni, usmerjeni selekcijski pritiski redko časovno in prostorsko usmerjeni in se pogosto tudi prekrivajo z drugimi karakteristikami tal.

Naravni izviri CO₂ (mofete) so ekstremni ekosistemi, kjer ogljikov dioksid (CO₂) geološkega izvora doseže površino tal in povzroča bistvene spremembe v sestavi talnega zraka. Koncentracija CO₂ v tleh pogosto močno preseže običajne talne in atmosferske koncentracije tega plina. To vpliva tudi na spremembo koncentracij drugih talnih plinov, kot je na primer kisik (O₂), katerega koncentracija je obratno sorazmerna s koncentracijo geološkega CO₂. Že v začetku 90. let prejšnjega stoletja so se pojavile prve objave o uporabi mofet za preučevanje dolgoročnih vplivov povečane koncentracije atmosferskega CO₂ na rastline, medtem ko so se prve raziskave, ki so bile osredotočene na talne mikroorganizme, pojavile skoraj 20 let kasneje. Večina dosedanjih raziskav je bila osredotočena skoraj izključno na procese v nadzemnih delih rastlin. Ker je CO₂ v mofetah geološkega izvora in se prezračuje skozi tla, ta najprej prizadene korenine rastlin in talne organizme. Za naše raziskave smo izbrali vrstno pestre in funkcionalno pomembne skupine talnih mikroorganizmov, arbuskularne mikorizne (AM) glive, arheje, bakterije in glive kvasovke.

Na območju travniških mofet v okolici Stavešincev smo v koreninah rastlin ocenjevali kolonizacijo korenin z AM glivami. V raziskavah nismo ugotovili statistično značilne povezave med parametri kolonizacije korenin z AM glivami in koncentracijo CO₂ tleh. Kolonizacija korenin z AM glivami je bila prisotna na območjih z visoko koncentracijo CO₂ (> 60 % CO₂ v talnem zraku), kjer smo opazili tudi prisotnost arbuskulov, ki kažejo na fiziološko aktivno simbiozo in izmenjavo hranil med rastlino in AM glivami. Sestavo združb AM gliv smo na območju travniških mofet določili z metodo pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche). Ugotovili smo, da je sestava združb AM gliv statistično značilno različna med območji z visoko koncentracijo CO₂ (> 60 % CO₂) in kontrolnimi območji (< 2 % CO₂ v talnem zraku). Največ variabilnosti v sestavi združb AM gliv z območij travniških mofet je pojasnila pH reakcija tal ($R^2 = 0,96$), sledijo koncentracija CO₂ v tleh ($R^2 = 0,78$), koncentracija O₂ v tleh ($R^2 = 0,73$), vpliv vzorčenja v različnih letih ($R^2 = 0,48$), koncentracija razpoložljivega fosforja ($R^2 = 0,46$) in skupnega dušika ($R^2 = 0,43$). Nižanje vrednosti pH tal na območjih mofet je pogojeno s prisotnostjo geološkega CO₂,

zato povečana koncentracija CO₂ v tleh in s tem inducirana hipoksija predstavljata glavna abiotska okoljska dejavnika, ki vplivata na ločevanje združb AM gliv. Da bi lahko preverili vpliv abiotskih dejavnikov okolja na sestavo združb AM gliv med geografsko oddaljenimi mofetami, smo poleg omenjene travniške mofete v okolici Stavešincev vključili v raziskavo tudi gozdne mofete na Stavešinskem vrhu, češke mofete v okolici Cheba in italijanske mofete Bossoleto. Tudi v tem primeru največ variabilnosti v sestavi združb AM gliv med geografsko oddaljenimi mofetami pojasni razlika v koncentraciji CO₂ v tleh med posameznimi območji znotraj mofet ($R^2 = 0,98$), sledita koncentracija O₂ v tleh ($R^2 = 0,91$) in pH reakcija tal ($R^2 = 0,86$). Združbe AM gliv, vzorčene s kontrolnih območij travniških mofet v okolici Stavešincev, imajo tudi statistično značilno večjo pestrost MOTU (izračunano s Hillovim številom 0), večjo izenačenost MOTU (izračunano s Hillovim številom 2) in večjo dominanco MOTU (izračunano s Hillovim številom ∞) v primerjavi s tistimi združbami, ki so bile vzorčene z območij z visoko koncentracijo CO₂. Taksona MOTU z največjim deležem sekvenc z območij z visoko koncentracijo CO₂ sta MOTU5 in MOTU22. Omenjena taksona MOTU sta najbolj podobna filotipoma Glo85 in Glo86, ki sta bila opisana kot specialista območij z visoko koncentracijo CO₂ (Maček in sod., 2011). Naša raziskava potrjuje, da sta Glo85 in Glo86 (MOTU5 in MOTU22) nekaj let po prvotni raziskavi združb AM gliv (Maček in sod., 2011) še vedno najbolj abundantna na območjih z visoko koncentracijo CO₂, vendar smo z uporabo metode pirosekvenciranja (454 GS-FLX, Roche) sedaj potrdili njuno prisotnost tudi na kontrolnih območjih, kjer sta sicer redka in prisotna v majhnem številu sekvenc.

Sestavo združb arhej in bakterij smo na območju travniških mofet določili na podlagi analize dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) in izdelave klonskih knjižnic (izolacija DNK, PCR, kloniranje, sekvenciranje po Sangerju). Sestava združb arhej in bakterij se je statistično značilno razlikovala med območji z visoko, srednjo in kontrolno koncentracijo CO₂. Glavni abiotski dejavniki, ki so statistično značilno vplivali na sestavo združb arhej in bakterij, so koncentracija O₂ v tleh, koncentracija CO₂ v tleh, rastlinam dostopni fosfor, skupni dušik in v primeru arhej tudi pH reakcija tal. Diverziteti arhej in bakterij (določena s Hillovimi števili 0, 2 in ∞) se ni statistično značilno razlikovala med območji z visoko koncentracijo CO₂, srednjo koncentracijo CO₂ in kontrolnimi območji. Prav tako nismo opazili statistično značilne povezave med diverziteti arhej in bakterij in koncentracijo CO₂ v tleh. Na območjih s povečano koncentracijo CO₂ smo opazili statistično večje število predstavnikov metanogenega razreda arhej *Methanomicrobia* in predstavnikov debela *Chloroflexi* in *Firmicutes* kot na kontrolnih območjih. Medtem ko smo na kontrolnih območjih opazili statistično večje število predstavnikov razreda *Thermoplasmata* in *Deltaproteobacteria*, v primerjavi z območji z visoko koncentracijo CO₂.

V naši raziskavi smo ugotovili, da so kvasovke, izolirane iz tal travniških mofet, ki so sposobne fermentirati D-glukozo, sposobne tudi rasti v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂. Rezultate so dodatno potrdili tudi testi rasti izbranih fakultativno anaerobnih kvasovk

iz zbirke EXF (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta) v atmosferi s povečano koncentracijo CO₂. Ugotovili smo, da se na območju travniških mofet pojavlja večje število fermentativnih kvasovk kot nefermentativnih kvasovk. Iz tal z območja z visoko koncentracijo CO₂ smo uspešno izolirali kvasovko *Occultifur* species, sp. nov., ki predstavlja novo, do sedaj še neopisano vrsto kvasovke.

Z raziskavami v okviru doktorske disertacije smo odgovorili na večino vprašanj, ki smo jih zastavili pri zasnovi poskusov. Arbuskularne mikorizne glive so prisotne na območjih z visoko koncentracijo talnega CO₂, kjer tvorijo tudi arbuskule. Abiotski dejavniki okolja, koncentracija CO₂ s tem inducirana hipoksija in vrednost pH v tleh, predstavljajo najmočnejši kazalec sprememb v sestavi združb AM gliv, arhej in bakterij na območjih naravnih izvirov CO₂. Ugotovili smo tudi, da na variabilnost v sestavi združb AM gliv vpliva tudi vzorčenje v različnih letih, nismo pa opazili vpliva vzorčenja v različnih mesecih znotraj posamezne rastne sezone. Na kontrolnih lokacijah travniških mofet v okolici Stavešincev smo v združbi AM gliv ugotovili večjo biodiverzitetu (glede na izračunana Hillova števila) v primerjavi z združbo, izpostavljeno ekstremnim razmeram na območju mofet. Razlik v biodiverziteti med združbami arhej in bakterij z območij različnih koncentracij CO₂ nismo opazili. V naši raziskavi smo ponovno potrdili prisotnost dveh specialistov AM gliv na območju travniških mofet v okolici Stavešincev z zelo sorodnimi sekvencami (Glo85 in Glo86 iz študije Maček in sod., 2011, ki ustrežata MOTU5 in MOTU22), kljub nekaj letnemu zamiku vzorčenja. Rezultati naše študije kažejo na pomembne ekološke posledice, ki nastanejo zaradi spremembe v sestavi mikrobnih združb v smeri večje abundance anaerobnih in metanogenih predstavnikov arhej in bakterij, kot tudi večjo številčnost fermentativnih kvasovk, ko koncentracije CO₂ v tleh dosežejo zadosten nivo, da povzročijo lokalno hipoksično stanje. Te spremembe vplivajo tako na sestavo združb talnih mikroorganizmov kot tudi na njihovo funkcijo. Podrobnejše analize vpliva teh sprememb na funkcijo mikrobnih združb na območju mofet bi podale še jasnejši vpogled v procese, ki potekajo v tleh teh zanimivih ekstremnih ekosistemov.

7.2 SUMMARY

Examining the processes regulating the diversity of different groups of organisms has long been one of the main aims of ecological research. Understanding these processes is essential for predicting responses of ecosystems to environmental change. Understanding the mechanisms of abiotic environmental factors influencing the structure of soil microbial communities is still limited and needs further research, but recent advances in DNA based methods have opened new avenues of research. However, conducting research in natural ecosystems is difficult due to specific characteristics of the soil ecosystems, where powerful and directed selection pressures are rarely temporally and spatially oriented and often tend to co-vary with other soil characteristics.

Natural CO₂ springs (mofettes) are extreme ecosystems where carbon dioxide (CO₂) of geological origin reaches the soil surface, resulting in significant changes in soil gas composition. Soil CO₂ concentrations often exceeds normal soil and atmospheric concentrations. This also influences other soil gases, such as oxygen (O₂) concentration, which is negatively correlated with the concentration of geological CO₂. The first publication regarding the use of mofettes to study the long-term effects of elevated concentrations of atmospheric CO₂ on plants emerged at the beginning of the 1990s, but the first survey focusing on soil microorganisms occurred almost 20 years later. Most of the research focused exclusively on the aboveground processes. However, because mofette CO₂ is of geological origin and vents through the soil, plant roots and soil organisms are the first to be affected by this CO₂ source. For our research we have therefore chosen functionally important groups of soil microorganisms with high species diversity; arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, archaea, bacteria, and yeasts.

For the purpose of this study we have investigated the colonization of plant roots with AM fungi within a meadow mofette near Stavešinci. There were no significant differences between the parameters of AM fungal colonization and the concentration of CO₂ in soil. Plant roots were also colonised with AM fungi in the locations with high CO₂ concentration (> 60 % in soil air). In these locations we have observed arbuscules in plant roots, which are indicators of a physiologically active symbiosis and nutrient exchange between the plant and the AM fungi. AM fungal community composition at the meadow mofette near Stavešinci was evaluated using pyrosequencing (454 GS-FLX, Roche). The results show that the AM fungal community composition significantly differs between the locations with high CO₂ concentration (> 60 % CO₂) and control locations (< 2 % CO₂ in soil air). The variability within the composition of AM fungal community was mostly explained by the difference in soil pH ($R^2 = 0.96$), followed by soil CO₂ concentration ($R^2 = 0.78$), soil O₂ concentration ($R^2 = 0.73$), sampling in different years ($R^2 = 0.48$), concentration of soil phosphorus ($R^2 = 0.46$) and total nitrogen ($R^2 = 0.43$). Lower pH values at mofettes are a consequence of high concentrations of geological CO₂. In order to investigate the influence of abiotic factors on the composition of AM fungal community

between geographically distant mofettes, we have included into study also forest mofettes at Stavešinski vrh, Czech mofettes near Cheb and Italian mofettes Bossoleto. The results of the canonical correspondence analysis of the composition of AM fungal community have shown that the variability in composition of AM fungal community between geographically distant mofettes was mostly explained by the difference in concentration of CO₂ in soil among different locations within the mofettes ($R^2 = 0.98$), followed by the difference in soil O₂ concentrations ($R^2 = 0.91$), and in soil pH ($R^2 = 0.86$). AM fungal communities sampled from the control locations of the meadow mofette near Stavešinci were significantly more MOTU (Molecular operational taxonomic unit) rich (accessed with Hill number 0), more even (accessed with Hill number 2) and more dominant (accessed with Hill number ∞) when compared to the communities sampled at locations with high CO₂ concentrations. The most abundant MOTUs with the highest number of sequences from high CO₂ locations were MOTU5 and MOTU22, which were found to be the most similar to the phylotypes Glo85 and Glo86 previously described as high CO₂ specialists (Maček et al., 2011). Our study confirms that Glo85 and Glo86 (i.e. MOTU5 and MOTU22, respectively) are still the most abundant phylotypes on the locations with high CO₂ concentrations. Pyrosequencing (454 FLX, Roche) enabled us to confirm their presence also in the control locations, despite their rarity and the low number of their sequences.

Archaeal and bacterial community composition in soil of the meadow mofette near Stavešinci was determined using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and by clone libraries (PCR, cloning, Sanger sequencing). The community composition of archaea and bacteria was significantly distinct between locations with high CO₂ concentrations, medium CO₂ and control locations. The variability in microbial community composition was mostly explained with the O₂ concentration in soil air, CO₂ concentration, phosphorus availability, total nitrogen concentration and soil pH. Archaeal and bacterial diversity (accessed with Hill's numbers) was not significantly distinct among the locations with high, medium or control CO₂ concentrations. In addition, no correlation between the diversity of archaea and bacteria and the CO₂ concentration in soil was observed. A significant increase in abundance of *Methanomicrobia* and the predominantly anaerobic *Chloroflexi* and *Firmicutes* was detected at the locations with high CO₂ concentrations compared to the control locations. Conversely, *Thermoplasmata* and *Deltaproteobacteria* were significantly more abundant in control locations compared to the locations with high CO₂ concentrations.

Yeasts, isolated from the soil of the meadow mofette, which were able to ferment D-glucose, were also capable to grow in an atmosphere with increased CO₂ concentration. The results were further confirmed with growth tests of selected facultative anaerobic yeasts from the EXF collection (Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana) in increased CO₂ concentration atmospheres. We found a higher abundance of fermentative yeasts in the whole area of the meadow mofette compared to yeasts not

capable to ferment D-glucose. Moreover, we have successfully isolated the yeast *Occultifur* species sp. nov., from high CO₂ concentration mofette soil, which is, according to all the tests performed within this study, a new, undescribed species.

This research, which was conducted in the context of the presented Ph.D. thesis, succeeded in answering most of the questions raised. Arbuscular mycorrhizal fungi are present in mofette locations with high CO₂ concentrations, where they also form arbuscules. Abiotic environmental factors, such as soil CO₂ concentration, induced hypoxia, and pH value, are the strongest predictors of the compositional changes across communities of arbuscular mycorrhizal fungi, archaea and bacteria in the areas of natural CO₂ springs. In addition, we have found that sampling in different years influenced the community composition of AM fungi, but no significant impact of sampling performed in different months within one vegetation season was observed. AM fungal community sampled from control locations within the meadow mofette locations near Stavešinci were more diverse (according to calculated Hill's numbers) compared to the AM fungal community sampled from locations with high CO₂ concentrations, while no significant difference in diversity of archaea and bacteria among locations with different CO₂ concentrations was recorded. In this study we confirmed the presence of two AM fungal specialists in the meadow mofette near Stavešinci with closely related sequences (i.e. MOTU5 and MOTU22). The results of our study show significant ecological consequences caused by changes in the composition of microbial community toward a greater abundance of anaerobic and methanogenic archaea and bacteria, as well as toward a greater abundance of fermentative yeast, when the concentration of CO₂ in the soil reaches sufficient level to cause localised hypoxia. These changes affect both the microbial community composition and its ecological functions. A more detailed study of the impact of these changes on the function of soil microbial communities sampled from natural CO₂ springs will provide a clearer insight into the processes taking place in the soil of these interesting extreme ecosystems.

8 VIRI

- Al - Traboulsi M., Sjögersten S., Colls J., Steven M., Craigon J., Black C. 2012. Potential impact of CO₂ leakage from carbon capture and storage (CCS) systems on growth and yield in spring field bean. *Environmental and Experimental Botany*, 80: 43–53
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410
- Anderson M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26: 32–46
- ARSO, 2013. Agencija Republike Slovenije za okolje
<http://www.arso.gov.si> (4. junij 2013)
- Baas-Becking L. G. M. 1934. *Geobiologie of Inleiding Tot de Milieukunde*. W. P. Van Stockum in Zoon: The Hague, The Netherlands: 263 str.
- Bago B., Pfeffer P. E., Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124: 949–957
- Beaubien S. E., Ciotoli G., Coombs P., Dictor M., Krüger M., Lombardi S., Pearce J., West, J. 2008. The impact of a naturally occurring CO₂ gas vent on the shallow ecosystem and soil chemistry of a Mediterranean pasture (Latera, Italy). *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2: 373–387
- Bennett A. E., Daniell T. J., Öpik M., Davison J., Moora M., Zobel M., Selosse M. A., Evans D. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungal networks vary throughout the growing season and between successional stages. *PLoS One*, 8: e83241
- Bent S. J., Forney L. J. 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME Journal*, 2: 689–695
- Bintrim S. B., Donohue T. J., Handelsman J., Roberts G. P., Goodman R.M. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 277–282
- Botha A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1–8
- Butinar L., Santos S., Spencer - Martins I., Oren A., Gunde - Cimerman N. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244: 229–234

- Butinar L., Spencer - Martins I., Gunde - Cimerman N. 2007. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91: 277–289
- Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Pena A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7: 335–336
- Chaban B., Ng S. Y., Jarrell K. F. 2006. Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 73–116
- Chang Y. J., Land M., Hauser L., Chertkov O., Del Rio T.G., Nolan M., Copelan A., Tice, H., Cheng J. F., Lucas S., Han C., Goodwin L., Pitluck S., Ivanova N., Ovchinnikova G., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Mavromatis K., Liolios K., Brettin T., Fiebig A., Rohde M., Abt B., Göker M., Detter J. C., Woyke T., Bristow J., Eisen J. A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N. C., Klenk H. P., Lapidus A. 2011. Non-contiguous finished genome sequence and contextual data of the filamentous soil bacterium *Ktedonobacter racemifer* type strain (SOSP1-21). *Standards in Genomic Sciences*, 5: 97–111
- Colwell R. K., Mao C. X., Chang J. 2004. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*, 85: 2717–2727
- Connell L., Redman R, Craig S., Scorzetti G., Iszard M., Rodriguez R. 2008. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology*, 56: 448–459
- Davison J., Öpik M., Zobel M., Vasar M., Metsis M., Moora M. 2012. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PLoS One*, 7: 1–8
- De Deken R. H. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology*, 44: 149–156
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. 2007. *Compendium of soil fungi*, Second ed. IHW-Verlag, Eching bei München, Nemčija: 672 str.
- Drummond A. J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled, J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T., Wilson A. 2011. Geneious version 5.5.7, Biomatters.

<http://www.geneious.com/> (15. maj 2013)

- Dumbrell A. J., Nelson M., Helgason T., Dytham C., Fitter A. H. 2010a. Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal*, 4: 337–345
- Dumbrell A. J., Nelson M., Helgason T., Dytham C., Fitter A. H. 2010b. Idiosyncrasy and overdominance in the structure of natural communities of arbuscular mycorrhizal fungi: is there a role for stochastic processes? *Journal of Ecology*, 98: 419–428
- Dumbrell A. J., Ashton P. D., Aziz N., Feng G., Nelson M., Dytham C., Fitter A. H., Helgason T. 2011. Distinct seasonal assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing. *The New Phytologist*, 190: 794–804
- Edgar R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26: 2460–2461
- Egnér 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. *Kungliga Lantbrukshögskolans Annaler*, 26: 199–215
- Ekelund F., Rønn R., Christensen S. 2001. Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 475–481
- Eler K. 2007. Dinamika vegetacije travnišč v slovenskem Submediteranu: vzorci in procesi ob spremembah rabe tal. Doktorska disertacija. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 169 str.
- Emerson B. C., Gillespie R. G. 2008. Phylogenetic analysis of community assembly and structure over space and time. *Trends in Ecology and Evolution*, 23: 619–630
- Erten H., Tangler H. 2010. Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 474–479
- Fierer N., Breitbart M., Nulton J., Salamon P., Lozupone C., Jones R., Robeson M., Edwards R. A., Felts B., Rayhawk S., Knight R., Rohwer F., Jackson R. B. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7059–7066

- Fitter A. H. 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology*, 95: 231–243
- Fitzsimons M. S., Miller R. M., Jastrow J. D. 2008. Scale-dependent niche axes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*, 158: 117–127
- Francis C. A., Beman J. B., Kuypers M. M. M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal*, 1: 19–27
- Fredlund E., Blank L. M., Schürner J., Sauer U., Passoth V. 2004. Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5905–5911
- Frerichs J., Oppermann B. I., Gwosdz S., Möller I., Herrmann M., Krüger M. 2013. Microbial community changes at a terrestrial volcanic CO₂ vent induced by soil acidification and anaerobic microhabitats within the soil column. *FEMS Microbiology Ecology*, 84: 60–74
- Gams W. 1992. The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi. V: *Fungi in Vegetation science*. Winterhoff W. (Ur.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 183–223
- Gotelli N. J., Colwell R. K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4: 379–391
- Griffiths A. D., Tawfik D. S. 2006. Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. *Trends in Biotechnology*, 24: 395–402
- Grobkopf R., Stubner S., Liesack W. 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4983–4989
- Guarro J., Gene J., Stchigel AM. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 454–500
- Gunde - Cimerman N., Zalar P., de Hood S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235–240
- Gunde - Cimerman N., Sonjak S., Zalar P., Frisvad J. C., Diderichsen B., Plemenitaš A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28: 1273–1278

- Guyard C., Séguy N., Cailliez J. C., Drobecq H., Polonelli L., Dei-Cas E., Mercenier A., Menozzi F.D. 2002. Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 961–971
- Hartnett D. C., Wilson W. T. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology*, 80: 1187–1195
- Hättenschwiler S., Miglietta F., Raschi A., Körner C. 1997. Thirty years of *in situ* tree growth under elevated CO₂: a model for future forest responses? *Global Change Biology*, 3: 463–471
- Hawksworth D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95: 641–655
- Hazard C., Gosling P., van der Gast C. J., Mitchell D. T., Doohan F. M., Bending G. D. 2013. The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME Journal*, 7: 498–508
- He X., Mouratov S., Steinberger Y. 2002. Temporal and spatial dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under the canopy of *Zygophyllum dumosum* Boiss. in the Negev Desert. *Journal of Arid Environments*, 52: 379–387
- Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394: 431
- Helgason T., Merryweather J. W., Denison J., Wilson P., Young J. P. W., Fitter A. H. 2002. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, 90: 371–384
- Hill, M. O., 1973. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54: 427–473
- Höfferle Š., Nicol G. W., Pal L., Hacin J., Prosser J. I., Mandić - Mulec I., 2010. Ammonium supply rate influences archaeal and bacterial ammonia oxidizers in a wetland soil vertical profile. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 302–315
- Husband R., Herre E. A., Turner S. L., Galler R., Young J. P. W. 2002. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371–384

- Hutchinson E. 1953. The concept of patterns in ecology. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 105: 1–12
- Hwang U. W., Kim W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 37: 215–228
- Jamnik M. 2005. Časovna in prostorska spremenljivost talne koncentracije CO₂ na naravnem izviru CO₂ Stavešinci. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 90 str.
- Janssen P. H., Yates P. S., Grinton B. E., Taylor P. M., Sait M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2391–2396
- Janssen P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1719–1728
- Jerman V., Metje M., Mandić - Mulec I., Frenzel P. 2009. Wetland restoration and methanogenesis: the activity of microbial populations and competition for substrates at different temperatures. *Biogeosciences*, 6: 1127–1138
- Jukes T. H., Cantor C. R. 1969. Evolution of protein molecules. V: Munro H. N. (Ur.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York: 21–132
- Kalra Y. P., Maynard D. G. 1991. Methods manual for forest soil and plant analysis. Information Report NOR-X-313: 116 str.
- Kivlin S. N., Hawkes C. V., Treseder K. K. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 2294–2303
- Klironomos J. N., Moutoglis P., Kendrick B., Widden P. 1993. A comparison of spatial heterogeneity of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in two maple-forest soils. *Canadian Journal of Botany*, 71: 1472–1480
- Klironomos J. N., McCune J., Hart M., Neville J. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters*, 3: 137–141
- Knapp D. G., Pintye A., Kovács G. M. 2012. The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS One*, 7: e32570

- Kosi B. 2012. Vpliv hipoksije in povečane koncentracije CO₂ na arbuskularno mikorizo. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 36 str.
- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., Van Elsas J. D., Mandić - Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2762–2771
- Kranjec I. 2008. Raznolikost genov za desaturacijo in elongazo pri glivah in njihova primernost za filogenetske študije. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 81 str.
- Krüger M., West J., Frerichs J., Oppermann B. I., Dictor M. C., Jouliand C., Jones D., Coombs P., Green K., Pearce J., May F., Möller I. 2009a. Ecosystem effects of elevated CO₂ concentrations on microbial populations at a terrestrial CO₂ vent at Laacher See, Germany. *Energy Procedia*, 1: 1933–1939
- Krüger M., Stockinger H., Krüger C., Schüssler A. 2009b. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183, 212–223
- Krüger M., Jones D., Frerichs J., Oppermann B. I., West J., Coombs P., Green K., Barlow T., Lister R., Shaw R., Strutt M., Möller I. 2011. Effects of elevated CO₂ concentrations on the vegetation and microbial populations at a terrestrial CO₂ vent at Laacher See, Germany. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 5: 1093–1098
- Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H., Schübler A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*, 193: 970–984
- Kurtzman C. P., Robnett C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331–371
- Kurtzman C., Fell J. W., Boekhout T. 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th Edition. Kurtzman C., Fell J. W., Boekhout T. (Ur.). Elsevier: 2354 str.
- Lal R. 2008. Carbon sequestration. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences*, 363: 815–830
- Lambers H., Teste F. P. 2013. Interactions between arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal plants: do non-mycorrhizal species at both extremes of nutrient availability play the same game? *Plant, Cell and Environment*, 36: 1911–1915
- Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. V: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Ur.),

Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Wiley, New York, str. 115–175

Lee J., Lee S., Young J. P. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 65: 339–349

Legendre P., Legendre L. 1998. Numerical ecology, 2nd English edn. Elsevier, Amsterdam: 852 str.

Lehtovirta - Morley L. E., Stoecker K., Vilcinskas A., Prosser J. I., Nicol G. W. 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 15892–15897

Lekberg Y., Koide R. T., Rohr J. R., Aldrich - Wolf L., Morton J. B. 2007. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology*, 95: 95–105

Lekberg Y., Schnoor T., Kjoller R., Gibbons S. M., Hansen L. H., Al-Soud W. A., Sørensen S. J., Rosendahl S. 2012. 454-Sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology*, 100: 151–160

Lemos L. N., Fulthorpe R. R., Triplett E. W., Roesch L. F. W. 2011. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods*, 86: 42–51

Lozupone C., Knight R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8228–8235

Lozupone C., Hamady M., Knight R. 2006. UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics*, 7: 371

Luštrik R. 2010. Favna mnogoščetincev trdega dna zgornjega infralitorala v slovenskem morju. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 37 str.

Mace G. M., Norris K., Fitter A. H. 2012. Biodiversity and ecosystem services: a multilayered relationship. *Trends in Ecology and Evolution*, 27: 19–26

Maček I. 2004. Odziv korenin izbranih kmetijsko pomembnih vrst na naravno povečano koncentracijo CO₂. Doktorska disertacija. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 105 str.

- Maček I., Pfanz H., Francetič V., Batič F., Vodnik D. 2005. Root respiration response to high CO₂ concentrations in plants from natural CO₂ springs. *Environmental and Experimental Botany*, 54: 90–99
- Maček I., Videmšek U., Kastelec D., Stopar D., Vodnik D. 2009. Geological CO₂ affects microbial respiration rates in Stavešinci mofette soils. *Acta Biologica Slovenica*, 52: 41–48
- Maček I. 2009. Molekulski pristopi pri raziskavah arbuskularne mikorize. *Acta Agriculturae Slovenica* 93, 77–85
- Maček I., Dumbrell A. J., Nelson M., Fitter A. H., Vodnik D., Helgason T. 2011. Local adaptation to soil hypoxia determines the structure of an arbuscular mycorrhizal fungal community in roots from natural CO₂ springs. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4770–4777
- Maček I., Kastelec D., Vodnik D. 2012. Root colonization with arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein (GRSP) concentration in hypoxic soils from natural CO₂ springs. *Agricultural and Food Science*, 21: 62–71
- Maček I. 2013. A decade of research in mofette areas has given us new insights into adaptation of soil microorganisms to abiotic stress. *Acta Agriculturae Slovenica*, 101: 209–217
- Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P. 2009. *Environmental Microbiology*, Second Edition, Academic Press: 624 str.
- Mandić - Mulec I., Gorenc K., Gams Petrišič M., Faganeli J., Ogrinc N. 2012. Methanogenesis pathways in a stratified eutrophic alpine lake (Lake Bled, Slovenia). *Limnology and Oceanography*, 57: 868–880
- Manter D. K., Delgado J. A., Holm D. G., Stong R. A. 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbiology Ecology*, 60: 157–166
- Marini M. 1997. CO₂ emission in volcanic areas: case histories and hazards. V: Plant responses to elevated CO₂. Evidence from natural CO₂ springs. Raschi A., Miglietta F., Tognetti R., van Gardinger P. R. (Ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 34–44
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B. 2007. Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. 4., dopolnjena in spremenjena izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.

- Martiny J. B., Bohannon B. J., Brown J. H., Colwell R. K., Fuhrman J. A., Green J. L., Horner-Devine M. C., Kane M., Krumins J. A., Kuske C. R., Morin P. J., Naeem S., Ovreås L., Reysenbach A. L., Smith V. H., Staley J. T. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature*, 4: 102–112
- McFarland J. W., Waldrop M. P., Haw M. 2013. Extreme CO₂ disturbance and the resilience of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 65: 274–286
- McGill B. J., Maurer B. A., Weiser M. D. 2006. Empirical evaluation of neutral theory. *Ecology*, 87: 1411–1423
- Merryweather J., Fitter A. H. 1998. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*-I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist*, 138: 117–129
- Miglietta F., Raschi A., Bettarini I., Resti R., Selvi F. 1993. Natural CO₂ springs in Italy – A resource for examining long-term response of vegetation to rising atmospheric CO₂ concentrations. *Plant, Cell and Environment*, 16: 873–878
- Miransari M. 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 917–930
- Mommer L., Wagemaker C. A. M., De Kroon H., Ouborg N. J. 2008. Unravelling below-ground plant distributions: a real-time polymerase chain reaction method for quantifying species proportions in mixed root samples. *Molecular Ecology Resources*, 8: 947–953
- Mommer L., Dumbrell A. J., Wagemaker C. A. M., Ouborg N. J. 2011. Belowground DNA-based techniques: untangling the network of plant root interactions. *Plant and Soil*, 348: 115–121
- Moora M., Berger S., Davison J., Öpik M., Bommarco R., Bruehlheide H., Kühn I., Kunin W.E., Metsis M., Rortais A., Vanatoa A., Vanatoa E., Stout J. C., Truusa M., Westphal C., Zobel M., Walther G. R. 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. *Journal of Biogeography*, 38: 1305–1317
- Nemergut D. R., Costello E. K., Hamady M., Lozupone C., Jiang L., Schmidt S. K., Fierer N., Townsend A. R., Cleveland C. C., Stanish L., Knight R. 2011. Global patterns in biogeography of bacterial taxa. *Environmental Microbiology*, 13: 135–144
- Neumann E., George E. 2010. Nutrient Uptake: The arbuscular mycorrhiza fungal symbiosis as a plant nutrient acquisition strategy. V: Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Koltai H., Kapulnik Y. (Ur.). Springer, Netherlands: 137–167

- Nielsen U. N., Ayres E., Wall D. H., Bardgett R. D. 2011. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European Journal of Soil Science*, 62: 105–116
- Noble R. R. P., Stalker L., Wakelin S. A., Pejčić B., Leybourne M. I., Hortle A. L., Michael K. 2012. Biological monitoring for carbon capture and storage – A review and potential future developments. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 10: 520–535
- O'Connor P. J., Smith S. E., Smith E. A. 2002. Arbuscular mycorrhizas influence plant diversity and community structure in a semiarid herbland. *New Phytologist*, 154: 209–218
- O'Donnell K. 1993. *Fusarium and its near relatives*. V: Reynolds D., Taylor J. (Ur.). The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford, United Kingdom: 225–233
- Õpik M., Moora M., Liira J., Kõljalg U., Zobel M., Sen R. 2003. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist*, 160: 581–593
- Õpik M., Moora M., Liira J., Zobel M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology*, 94: 778–790
- Õpik M., Saks U., Kennedy J., Daniell T. 2008. Global diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi – community composition and links with functionality. *Mycorrhiza*, 89–111
- Õpik M., Metsis M., Daniell T. J., Zobel M., Moora M. 2009. Large-scale parallel 454 sequencing reveals ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist*, 184: 424–437
- Õpik M., Vanatoa A., Vanatoa E., Moora M., Davison J., Kalwij J. M., Reier U., Zobel M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystem distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, 188: 223–241
- Õpik M., Zobel M., Cantero J. J., Davison J., Facelli J. M., Hiiesalu I., Jairus T., Kalwij J. M., Koorem K., Leal M. E., Liira J., Metsis M., Neshataeva V., Paal J., Phosri C., Põlme S., Reier Ü., Saks Ü., Schimann H., Thiéry O., Vasar M., Moora M. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 23: 411–430

- Oppermann B. I., Michaelis W., Blumenberg M., Frerichs J., Schulz H. M., Schippers A., Beaubien S. E., Krüger M. 2010. Soil microbial community changes as a result of long-term exposure to a natural CO₂ vent. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74: 2697–2716
- Orgiazzi A., Bianciotto V., Bonfante P., Daghino S., Ghignone S., Lazzari A., Lumini E., Mello A., Napoli C., Perotto S., Vizzini A., Bagella S., Murat C., Girlanda M. 2013. 454 pyrosequencing analysis of fungal assemblages from geographically distant, disparate soils reveals spatial patterning and a core mycobiome. *Diversity*, 5: 73–98
- Palmer M. W. 2013. Ordination.
<http://ordination.okstate.edu> (4. junij 2013)
- Patil R. H., Colls J. J., Steven M. D. 2010. Effects of CO₂ gas as leaks from geological storage sites on agro-ecosystems. *Energy*, 35: 4587–4591
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 763–775
- Perata P., Armstrong W., Voeselek L. A. C. J. 2011. Plants and flooding stress. *New Phytologist*, 19: 269–273
- Pezdič J., Žižek D. 1993. Areas of mineral water: Research on the influence area where mineral waters originate. *Quark*: 35–39
- Pezdič J., Žižek D., Wolf M., Trettin R., Stichler W., Fritz P. 1998. Influence of geogenic carbon dioxide on the plants grow. *RMZ-Materials and Geoenvironment*, 45: 154–157
- Pfanz H., Vodnik D., Wittmann C., Ascan G., Raschi A. 2004. Plants and geothermal CO₂ exhalations - survival and adaptation to a high CO₂ environment. V: *Progress in Botany*, 65. Esser K. (Ur.), Berlin: 499–538
- Pfanz H., Vodnik D., Wittmann C., Aschan G., Batič F., Turk B., Maček I. 2007. Photosynthetic performance (CO₂-compensation point, carboxylation efficiency, and net photosynthesis) of timothy grass (*Phleum pratense* L.) is affected by elevated carbon dioxide in post-volcanic mofette areas. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 41–48
- Phaff H. J., Starmer W. T. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soil. V: *The Yeasts. Biology of yeasts*, 2nd edn, vol 1. Rose A. H., Harrison J. S. (Ur.). Academic, London: 123–180
- Pires J. C. M., Martins F. G., Alvim - Ferraz M. C. M., Simões M. 2011. Recent

- developments on carbon capture and storage: An overview. *Chemical Engineering Research and Design*, 89: 1446–1460
- Plestenjak G. 2006. Zaloge glomalina na rastiščih z naravno povečano koncentracijo CO₂. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 39 str.
- Pronk J. T., Steensma H. Y., van Dijken J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12: 1607–1633
- Prosser J. I., Bohannon B. J. M., Curtis T. P., Ellis R. J., Firestone M. K., Freckleton R. P., Green J. L., Green L. E., Killham K., Lennon J. J., Osborn A. M., Solan M., van der Gast C. J., Young J. P. 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 384–392
- Quinton J. N., Govers G., van Oost K., Bardgett R. D. 2010. The impact of agricultural soil erosion on biogeochemical cycling. *Nature Geoscience*, 3: 311–314
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation For Statistical Computing.
<http://www.R-project.org> (12. april 2013)
- Ramette A., Tiedje J. M. 2007. Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbiology Ecology*, 53: 197–207
- Rands M. R. W., Adams W. M., Bennun L., Butchart S. H. M., Clements A., Coomes D., Entwistle A., Hodge I., Kapos V., Scharlemann J. P. W., Sutherland W. J., Vira B., 2010. Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science*, 329: 1298–1303
- Raschi A., Miglietta F., Tognetti R., van Gardingen P. 1997. Plant responses to elevated CO₂. Evidence from natural CO₂ springs. Cambridge University Press: 272 str.
- Redecker D., Hijri I., Wiemken A. 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobotanica*, 38: 113–124
- Remy W., Taylor T. N, Hass H., Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 11841–11843
- Renner T., Eusterhues K., Pfanz H., Totsche K. U. 2011. Influence of geogenic CO₂ on mineral and organic soil constituents on a mofette site in the NW Czech Republic. *European Journal of Soil Science*, 62: 572–580

- Rodrigues F., Ludovico P., Leão C. 2006. Sugar Metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. V: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. The Yeast Handbook, Gábor P., Carlos R. (Ur.). Berlin, Springer: 101–121
- Rosendahl S., Stukenbrock E. H. 2004. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology*, 13: 3179–3186
- Rosendahl S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178: 253–266
- Russell D. J., Schulz H. J., Hohberg K., Pfanz H. 2011. Occurrence of collembolan fauna in mofette fields (natural carbon-dioxide springs) of the Czech Republic. *Soil Organisms*, 83: 489–505
- Sampaio J. P., Bauer R., Begerow D., Oberwinkler F. 1999. *Occultifur externus* sp. nov., a new species of simple-pored auricularioid heterobasidiomycete from plant litter in Portugal. *Mycologia*, 91: 1094–1101
- Santos - González J. C., Finlay R. D., Tehle A. 2007. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5613–5623
- Saßmannshausen F. 2010. Vegetationsökologische Charakterisierung terrestrischer Moffetenstandorte am Beispiel des west – tschechischen Plesná Tals, Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. Rer. Nat. Der Fakultät Biologie und Geografie an der Universität Duisburg – Essen: 224 str.
- Schechter S. P., Bruns T. D. 2008. Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Molecular Ecology*, 17: 3198–3210
- Scheublin T. R., van Logtestijn R. S. P., van der Heijden M. G. A. 2007. Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology*, 95: 631–638
- Schloss P. D. 2009. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PloS One*, 4: e8230
- Schloss P. D., Westcott S. L. 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 3219–3226

- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105: 1413–1421
- Schwarzott D., Schüßler A. 2001. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza*, 10: 203–207
- Simon L., Lalonde M., Bruns T. D. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonising roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 291–295
- SIST ISO 10390. 2006. Kakovost tal – Ugotavljanje pH. Slovenski inštitut za standardizacijo.
- SIST ISO 13878, 1999. Kakovost tal – Določevanje skupnega dušika po suhem sežigu (elementna analiza). Slovenski inštitut za standardizacijo.
- Smallegange R. C., Schmied W. H., van Roey K. J., Verhulst N. O., Spitzen J., Mukabana W. R., Takken W. 2010. Sugar-fermenting yeast as an organic source of carbon dioxide to attract the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 9: 1–15
- Smith S. E., Read D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, Third Edition, London, Academic Press: 787 str.
- Spencer J. F. T., Spencer D. M. 1997. *Yeasts in natural in artificial habitats*. Springer - Verlag. Berlin, Heidelberg: 381 str.
- Stahl D. A., Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. V: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Ur.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, England: 205–248
- Stickland L. H. 1956. The Pasteur effect in normal yeast and its inhibition by various agents. *Biochemistry Journal*, 64: 503–515
- Stockinger H. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. Doctoral Dissertation. Munich. Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität: 164 str.
- Sýkorová Z., Ineichen K., Wiemken A., Redecker D. 2007. The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza*, 18: 1–14

- Šibanc N., Dumbrell A. J., Mandić - Mulec I., Maček I. 2014. Impacts of naturally elevated soil CO₂ concentrations on communities of soil archaea and bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 68: 348–356
- Ter Braak C. J. F., 1987. Ordination. V: *Data analysis in community and landscape ecology*. Jongman R. H. G., ter Braak C. J. F. van Tongeren O. F. R. (Ur.). Wageningen, Pudoc: 91–173
- Thauer R. K., Kaster A. K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 579–591
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876–4882
- Tisserant E., Malbreil M., Kuo A., Kohler A., Symeonidi A., Balestrini R., Charron P., Duensing N., Frei Dit Frey N., Gianinazzi - Pearson V., Gilbert L. B., Handa Y., Herr J. R., Hijri M., Koul R., Kawaguchi M., Krajinski F., Lammers P. J., Masclaux F. G., Murat C., Morin E., Ndikumana S., Pagni M., Petitpierre D., Requena N., Rosikiewicz P., Riley R., Saito K., San Clemente H., Shapiro H, van Tuinen D., Bécard G., Bonfante P., Paszkowski U., Shachar - Hill Y. Y., Tuskan G. A., Young P. W., Sanders I. R., Henrissat B., Rensing S. A., Grigoriev I. V., Corradi N., Roux C., Martin F. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 20117–20122
- Tome D. 2006. *Ekologija*. Ljubljana. Tehniška založba Slovenije: 344 str.
- Trouvelot A., Kough J. L., Gianinazzi - Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un Système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. V: *Physiological and genetical aspect of mycorrhizae*, Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (Ur.). Pariz, INRA press: 217–221
- Urbanič G. 2004. *Ekologija in razširjenost mladoletnic (Insecta: Trichoptera) v nekaterih vodotokih v Sloveniji*. Doktorska disertacija. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 188 str.
- Usall J., Teixidó N., Viñas I. 2000. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 58: 83–92

- Van der Gast C. J., Gosling P., Tiwari B., Bending G. D. 2011. Spatial scaling of arbuscular mycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. *Environmental Microbiology*, 13: 241–249
- Van der Heijden M. G. A., Klironomos J. N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I. R. 1998. Mycorrhizal fungi diversity determines plant biodiversity, ecosystems variability and production. *Nature*, 396: 69–72
- Van der Heijden M. G. A., Wiemken A., Sanders I. R. 2003. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plants. *New Phytologist*, 157: 569–578
- Van Dijken J. P., Scheffers W. A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 199–224
- Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T. J., Watson I. J., Duck J. M., Fitter A. H., Young Y.P. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11: 1555–1564
- Vandenkoornhuyse P., Ridgway K. P., Watson I. J., Fitter A. H., Young J. P. W. 2003. Co-existing grass species have distinct arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, 12: 3085–3095
- Veiga R. S. L., Faccio A., Genre A., Pieterse C. M. J., Bonfante P., van der Heijden M. G. A. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce growth and infect roots of the non-host plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 36: 1926–1937
- Vicente V., Attili - Angelis D., Pie M. R., Queiroz - Telles F., Cruz L. M., Najafzadeh M. J., de Hoog G. S., Zhao J., Pizzirani - Kleiner A. 2008. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in Mycology*, 61: 137–144
- Videmšek U., Turk B., Vodnik D. 2006. Root aerenchyma – formation and function. *Acta Agriculturae Slovenica*, 87: 445–454
- Videmšek U., Hagn A., Suhadolc M., Radl V., Knicker H., Schloter M., Vodnik D. 2009. Abundance and diversity of CO₂-fixing bacteria in grassland soils close to natural carbon dioxide springs. *Microbial Ecology*, 58: 1–9
- Visser W., Scheffers W. A., Batenburg - van der Vegte W., van Dijken J. P. 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3785–3792

- Vodnik D., Pfanž H., Maček I., Lojen S., Batič F. 2002a. Photosynthesis of cocksbur [*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.] at sites of natural elevated CO₂ concentrations. *Photosynthetica* 40, 575–579
- Vodnik D., Pfanž H., Wittmann C., Maček I., Kastelec D., Turk B., Batič F. 2002b. Photosynthetic acclimation in plants growing near a carbon dioxide spring. *Phyton*, 42: 239–244
- Vodnik D., Kastelec D., Pfanž H., Maček I., Turk B. 2006. Small-scale spatial variation in soil CO₂ concentration in a natural carbon dioxide spring and some related plant responses. *Geoderma*, 133: 309–319
- Vodnik D., Videmšek U., Pintar M., Maček I., Pfanž H. 2009. The characteristics of soil CO₂ fluxes at a site with natural CO₂ enrichment. *Geoderma*, 150: 32–37
- Vozel Š. 2012. Vpliv visokoaktivnega humanega fragmenta PFK-M (6-fosfofrukto-1-kinaze) na metabolizem pивske kvasovke. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 82 str.
- Walker G. M. 2011. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99: 25–34
- Wang B., Qiu Y.L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16: 299–363
- Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5261–5267
- Weiher E., Keddy P. A. 1995. Assembly rules, null models, and trait dispersion: new questions from old patterns. *Oikos*, 74: 159–164
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703
- WMO, 2013. Greenhouse gas bulletin. The state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2012, 9: 17 str.
- Yamada T., Sekiguchi Y., Hanada S., Imachi H., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. 2006. *Anaerolinea thermolimos* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterium phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1331–1340

Yurkov A. M., Kemler M., Begerow D. 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5: 24–35

Zuur A. F., Ieno E. N., Smith G. M. 2007. *Analysing ecological data*. Springer: 672 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici in prijateljici doc. dr. Ireni Maček za vso spodbudo, pomoč in usmerjanje med opravljanjem doktorske disertacije ter za vse izjemne priložnosti, ki so se mi odprle v tem času. Hkrati se ji zahvaljujem za vse diskusije in vsesplošno širjenje entuziazma za raziskovalno delo.

Rada bi se zahvalila tudi dr. Thorunn Helgason iz Univerze v Yorku za možnost gostovanja in opravljanja raziskav biodiverzitete arbuskularnih mikoriznih gliv v njenem laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi dr. Alexu J. Dumbrellu za vso pomoč pri odkrivanju sveta bioinformatike in pomoč pri pisanju skupnih člankov.

Prof. dr. Ines Mandić - Mulec in sodelavcem (dr. Luka Ausec, dr. Barbara Kraigher, dr. Miha Černigoj, dr. Levin Pal) se zahvaljujem za prijetno gostovanje v laboratorijih katedre za mikrobiologijo tekom opravljanja raziskav biodiverzitete arhej in bakterij. Hvala vam za vse diskusije in pomoč pri laboratorijskem delu ter med pisanjem članka.

Doc. dr. Poloni Zalar in Mojci Šere hvala za pomoč pri raziskavah biodiverzitete kvasovk ter za prijetno preživet čas na katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov.

Želim se zahvaliti tudi izr. prof. dr. Eleni Varljen Bužan in prof. dr. Nini Gunde - Cimerman za hiter pregled doktorske disertacije, veliko fleksibilnost pri usklajevanju datumov zagovorov in predvsem vse konstruktivne komentarje na vsebino doktorske disertacije.

Iskrena hvala Mihi Šijancu za pomoč pri vzorčenju, saj ga brez njegovega truda ne bi uspela izvesti. Prav tako se zahvaljujem Aniti Direnbek, da smo lahko pri njej doma vzpostavili terenski laboratorij za izolacijo korenin iz talnih izvrtkov. Hvala tudi njeni družini, sorodnikom, sosedom in ostalimi sovaščanom za popestritev neskončnih ur pranja korenin.

Hvala doc. dr. Andreju Ceglarju in doc. dr. Klemnu Elerju za pomoč in potrpežljivost pri

prvih korakov učenja analize podatkov s programskim jezikom R.

Dr. Borisu Turku in doc. dr. Klemnu Elerju hvala za popis rastlin z območja travniške mofete v okolici Stavešincev.

Sonji Lubej, prof., za lektoriranje.

Nini Štajner, Jerneji Jamnikar in dr. Petri Ratajc hvala za pomoč pri finaliziranju doktorske disertacije.

Ob koncu, vendar najpomembneje, pa bi se rada zahvalila mami, babici in dedku za neizmerno spodbudo in podporo, vedno in povsod.

Vsi prijatelji in domači, iskrena hvala za razumevanje, zakaj v zadnjih letih nikoli nisem imela dovolj časa za druženje.

Doktorsko disertacijo posvečam svoji super babici,

ki je prehitro odšla na lepše, vendar bo

vedno ostala z menoj.

PRILOGA A

Sestava plinov v talnem zraku na mestih, kjer smo vzorčili tla za analizo sestave združb arhej in bakterij na območju travniških mofet v okolici Stavešincev. Predstavljeni so podatki za kontrolna območja (kontrola), območja s srednjo koncentracijo CO₂ (srednji CO₂) ter območja z visoko koncentracijo CO₂ (visok CO₂). Številke (1, 2, 3) predstavljajo posamezne vzorce, medtem ko črke (a, b, c) predstavljajo ponovitve, ki smo jih združili pred izolacijo DNK iz tal. Predstavljene so koncentracije ogljikovega dioksida (CO₂), v % (v/v) koncentracije kisika (O₂) v % (v/v), koncentracije metana (CH₄) v % (v/v) in količina vodikovega sulfida (H₂S) in ogljikovega monoksida (CO) v delih na milijon (ppm).

Vzorec	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	CH ₄ (%)	H ₂ S (ppm)	CO (ppm)
Kontrola 1a	0,2	21,0	0	0	0
Kontrola 1b	0,2	21,0	0	0	0
Kontrola 1c	0,2	21,0	0	0	0
Kontrola 2a	0,2	21,1	0	0	0
Kontrola 2b	0,1	21,1	0	0	0
Kontrola 2c	0,1	21,0	0	0	0
Kontrola 3a	0,2	20,8	0	0	0
Kontrola 3b	0,2	21,0	0	0	0
Kontrola 3c	0,2	20,9	0	0	0
Srednji CO ₂ 1a	12,6	18,6	0	0	0
Srednji CO ₂ 1b	11,1	18,9	0	0	0
Srednji CO ₂ 1c	12,0	18,8	0	0	0
Srednji CO ₂ 2a	12,4	19	0	0	0
Srednji CO ₂ 2b	20,2	17,5	0	0	0
Srednji CO ₂ 2c	18,1	18,1	0	0	0
Srednji CO ₂ 3a	11,1	18,9	0	0	0
Srednji CO ₂ 3b	13,9	18,5	0	0	0
Srednji CO ₂ 3c	13,3	18,8	0	0	0
Visok CO ₂ 1a	99,9	1,5	0,1	2	0
Visok CO ₂ 1b	49,7	11,0	0	0	0
Visok CO ₂ 1c	99,9	0,6	0,1	2	0
Visok CO ₂ 2a	99,9	0,9	0,1	1	0
Visok CO ₂ 2b	47,6	12,8	0	0	0
Visok CO ₂ 2c	99,9	2,3	0,2	0	0
Visok CO ₂ 3a	99,9	1,4	0,1	2	0
Visok CO ₂ 3b	88,8	3,5	0,5	3	0
Visok CO ₂ 3c	84,2	5,8	0,1	3	0