

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Borut KOSI

**VPLIV HIPOKSIJE IN POVEČANE KONCENTRACIJE
CO₂ NA
ARBUSKULARNO MIKORIZO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Borut KOSI

**VPLIV HIPOKSIJE IN POVEČANE KONCENTRACIJE CO₂ NA
ARBUSKULARNO MIKORIZO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF HYPOXIA AND ELEVATED CO₂
CONCENTRATION ON ARBUSCULAR MYCORRHIZA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin in informatiko, Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Ireno MAČEK.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik : prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo

Član: prof. dr. Domen LEŠTAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo

Član: doc. dr. Irena MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo

Datum zagovora:

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

Borut Kosi

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- Dn Dn
DK UDK 581.5: 551.23: 631.466.12 (043.2)
KG mikoriza/arbuskularne mikorizne glive/temni septirani endofiti/mofete/ogljikov dioksid/hipoksija
KK Agris F40/F62
AV KOSI, Borut
SA MAČEK, Irena (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univeza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2012
IN VPLIV HIPOKSIJE IN POVEČANE KONCENTRACIJE CO₂ NA ARBUSKULARNO MIKORIZO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 36, [3] str., 3 pregl., 14 sl., 1 pril., 43 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Z namenom ocene kolonizacije korenin z arbuskularnimi mikoriznimi (AM) in temnimi septiranimi endofitskimi (DSE) glivami smo vzorčili korenine rastlin vrste rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). Raziskave smo izvedli na območju mofet (naravnih izvirov CO₂) v okolici Cheba na Češkem, kjer so rastline dolgoročno izpostavljene povečani koncentraciji CO₂ geološkega izvora in posledično talni hipoksiji. Izmerjene koncentracije CO₂ v tleh so bile v razponu od 0,3 do 99,9 % CO₂, kar sovпада s koncentracijami O₂ v tleh (od 20,3 do 0,3 %). Koncentracija CO₂ in O₂ v tleh sta statistično značilno negativno povezani. Ugotovili smo tudi negativno povezavo med koncentracijo CO₂ v tleh in višino rastlin. Med koncentracijo talnih plinov in talno vrednostjo pH ni bilo statistično značilne povezave, prav tako ni bilo statistično značilne povezave med koncentracijo talnih plinov in različnimi parametri mikorizne kolonizacije v koreninah vzorčenih rastlin. Frekvenca delov korenin z AM glivami je bila v povprečju $81,4 \pm 4,9$ %. Gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo je bila v povprečju $37,3 \pm 3,5$ % in gostota arbuskulov v koreninski skorji $13,4 \pm 2,1$ %. Arbuskuli so bili prisotni v koreninah tudi na območjih s talno hipoksijo, kar kaže na fiziološko aktivno simbiozo med AM glivami in rastlinami in aktivno izmenjavo hranil v takih razmerah. Povprečna frekvenca delov korenin z DSE glivami je bila $32,3 \pm 4,3$ %. Ugotovili smo, da povečana talna koncentracija CO₂ na območju čeških mofet ni vplivala na koloniziranost korenin z AM in DSE glivami pri vrsti rušnata masnica.

KEY WORDS DOCUMENTATION

Dn Dn
 DK UDC 581.5: 551.23: 631.466.12 (043.2)
 KG mycorrhiza/arbuscular mycorrhizal fungi/dark septate endophytes/mofette/carbon dioxide/ hypoxia
 KK Agris F40/F62
 AU KOSI, Borut
 AA MAČEK, Irena (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
 PY 2012
 TI THE EFFECT OF HYPOXIA AND ELEVATED CO₂ CONCENTRATION ON ARBUSCULAR MYCORRHIZA
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XI, 36, [3] p., 3 tab., 14 fig., 1 ann., 43 ref.
 LA sl
 AL sl / en
 AB Roots of *Deschampsia caespitosa* (L.) PB. were sampled in order to assess root colonization with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and dark septate endophytes (DSE). Roots were sampled in a mofette field (natural CO₂ springs) in the Cheb Basin in Czech Republic, where plants are exposed to long-term elevated CO₂ concentration of geological origin and soil hypoxia. Soil CO₂ concentration ranged from 0.3 to 99.9 % and was negatively correlated to soil O₂ concentration that ranged from 20.3 % to 0.3 %. Concentrations of CO₂ and O₂ in soil were significantly negatively correlated. In addition, negative correlation between soil CO₂ concentration and plant height was found. On the other hand, soil pH was not correlated with soil CO₂, moreover, no significant correlation between soil CO₂ concentration and various parameters of mycorrhizal colonization in the roots of sampled plants was found. Frequency of AM fungal root colonization was in average 81.4 ± 4.9 %. The density of arbuscules in the colonized root cortex was in average 37.3 ± 3.5 % and density of arbuscules in the total root cortex was 13.4 ± 2.1 %. Arbuscules were present in roots also in the areas with confirmed soil hypoxia, suggesting a physiologically active symbiosis between AM fungi and plants and active exchange of nutrients between both partners in these conditions. Average frequency of colonization of roots with DSE fungi was 32,3 ± 4,3 %. In conclusion, geological CO₂ and soil hypoxia had no significant effect on root colonization with AM and DSE fungi in *Deschampsia caespitosa* (L.) PB.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Slovarček manj znanih izrazov in okrajšave in simboli	X
Kazalo prilog	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 NARAVNI IZVIRI CO ₂ (MOFETE)	2
2.2 MIKORIZA	4
2.3 TEMNE SEPTIRANE ENDOFITSKE GLIVE	8
2.4 KVANTITATIVNO OCENJEVANJE PRISOTNOSTI ENDOFITSKIH GLIV V OKOLJU	9
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 OPIS OBMOČJA IN VZORČENJE RASTLIN	12
3.2 BARVANJE KORENIN IN MIKROSKOPIRANJE	13
4 REZULTATI	16
4.1 TALNI PARAMETRI	16
4.2 KEMIJSKI PARAMETRI, MERJENI V NADZEMNIH DELIH RASTLIN	18
4.3 VIŠINA RASTLIN	20
4.4 KOLONIZACIJA KORENIN Z AM IN DSE GLIVAMI	20
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1 RAZPRAVA	26
5.1.1 Vpliv talne koncentracije CO ₂ na mofetah na AM glive	27
5.1.2 Vpliv CO ₂ na DSE glive	28

5.1.3 Zaključek	28
5.2 SKLEPI	30
6 POVZETEK	31
7 VIRI	32
ZAHVALE	
PRILOGA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Povprečje različnih talnih kemijskih parametrov in značilnost povezave s talno koncentracijo CO ₂ .	16
Preglednica 2: Povprečje različnih kemijskih parametrov, merjenih v nadzemnih delih rušnate masnice (<i>Deschampsia caespitosa</i>) in značilnost povezave s talno koncentracijo CO ₂ .	18
Preglednica 3: Skupna povprečja parametrov kolonizacije korenin z AM in DSE glivami.	21

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Model naravnih vrelcev (mofet) Hartoušov	3
Slika 2: Glavne morfološke značilnosti arbuskularne mikorize	6
Slika 3: Vpliv talnega pH na dostopnost hranil v tleh. Širina osenčenih območij kaže stopnjo dostopnosti hranil do rastlinskih korenin	7
Slika 4: Filogenetsko drevo gliv in pripadnost posameznih taksonov gliv k določenim sterolom	11
Slika 5: Prenosni analizator plinov GA 2000 (Ansyco, Nemčija)	13
Slika 6: Povezave med koncentracijo CO ₂ v tleh in različnimi talnimi parametri iz območja čeških mofet (C, N, C/N razmerjem, organsko snovjo v tleh, P ₂ O ₅ , K ₂ O, pH, koncentracija O ₂ v tleh)	17
Slika 7: Povezave med talno koncentracijo CO ₂ in različnimi kemijskimi parametri, merjenimi v nadzemnih delih rušnate masnice (<i>Deschampsia caespitosa</i>) iz območja čeških mofet (N, C, razmerje C/N, P, K,).	19
Slika 8: Povezava med koncentracijo CO ₂ v tleh in višino rastlin vrste rušnata masnica (<i>Deschampsia caespitosa</i>)	20
Slika 9: Kolonizacija korenin z AM glivami in značilne strukture (arbuskuli). Foto: B. Kosi	21
Slika 10: Kolonizacija z AM glivami in arbuskuli. Foto: B. Kosi	22
Slika 11: Temne septirane endofitske (DSE) glive v korenini rušnate masnice (<i>Deschampsia caespitosa</i>) in mikrosklerocij. Foto: B. Kosi	22
Slika 12: Povezave med koncentracijo CO ₂ v tleh in različnimi parametri kolonizacije korenin z AM glivami: F (frekvenca delov korenin z glivo), M (intenziteta mikorize), a (gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo), A (gostota arbuskulov v koreninski skorji)	23

- Slika 13: Povezave med različnimi parametri kolonizacije z AM glivami. Opazili smo statistično značilne povezave med parametri kolonizacije: F (frekvenca delov korenin z glivo) in M (intenziteta mikorize), M in A (gostota arbuskulov v koreninski skorji) ter a (gostota arbuskulov v delu skorje z mikorizno kolonizacijo) in A. 24
- Slika 14: Povezave med parametri kolonizacije z DSE glivami in koncentracijo CO₂ v tleh 25

SLOVARČEK MANJ ZNANIH IZRAZOV

Mofeta	talni izvir plinskega ogljikovega dioksida.
Hifa	tanka nitka, ki jo tvorijo celice gliv.
Intercelularne hife	hife gliv, ki so med celicami koreninske skorje.
Intracelularne hife	hife gliv, ki so v celicah koreninske skorje.
Ekstraradikalni micelij	preplet glivnih hif, ki izraščajo iz korenin.
Arbuskul	fino razvejane hife znotraj celic koreninske skorje, kjer poteka izmenjava hranil med AM glivo in rastlino.
Vezikel	struktura arbuskularnih mikoriznih gliv z založno funkcijo.
Korteks	koreninska skorja.
Hipoksija	razmere, kjer primanjkuje kisika.
Anoksija	razmere brez kisika.
Spora	tros, razmnoževalna struktura pri glivah.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AM	arbuskularna mikoriza / arbuskularne mikorizne
DSE	temni septirani endofiti
ppm	part per milion – milijonski del
EM	ektomikoriza
PLFA	fosfolipidna maščobna kislina

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pomožni list za ocenjevanje kolonizacije korenin z AM glivami

1 UVOD

Naravni izviri CO₂ ali mofete so območja, kjer na površje tal prihaja ogljikov dioksid geološkega izvora v obliki plina ali pa je raztopljen v vodi. V zgodovini se je ogljikov dioksid zaradi tektonske aktivnosti in taljenja karbonatnih kamnin pri velikih tlakih in temperaturi ujel v plašč zemljine skorje. Območje naših raziskav je območje naravnih izvirov CO₂ Hartušov na severozahodu Republike Češke, v okolici Cheba. Severovzhodni del Cheba je eden najbolj potresno aktivnih področij v Srednji Evropi. Za potresno aktivnost v tej kotlini so predvsem značilni številni majhni potresi (Pfanž in sod., 2004).

Na tem območju koncentracija talnega ogljikovega dioksida močno presega običajno koncentracijo tega plina v talnem zraku, kar vpliva na prisotne organizme.

V zadnjih dvajsetih letih so na naravnih izvirov CO₂ potekale številne raziskave odziva različnih organizmov na naravno povečano koncentracijo CO₂. Predmet raziskav je bil usmerjen predvsem na odziv nadzemnih delov rastlin na povečano atmosfersko koncentracijo CO₂, ne pa tudi na povečano talno koncentracijo CO₂, kjer je vpliv geološkega CO₂ na prisotne organizme največji (Maček in sod., 2005). Ravno na takih rastiščih z ekstremnimi plinskimi razmerami je o odzivu talnih organizmov, vključno z arbuskularnimi mikoriznimi (AM) glivami, znanega zelo malo. Tako je edina do sedaj znana raziskava AM gliv izven slovenskih mofet (Maček in sod., 2011, 2012) potekala na naravnem izviru CO₂ Hakanoa na Novi Zelandiji, kjer je atmosferska koncentracija CO₂ znašala do 674 ppm, medtem ko koncentracija talnih plinov v tej študiji ni bila merjena. Raziskava je bila tako usmerjena, kot večina drugih raziskav na mofetah, na oceno učinkov dolgoročnega povečanja atmosferskega ogljikovega dioksida (do cca 700 ppm) na mikorizo (Rillig in sod., 2000).

V diplomskem delu smo se osredotočili na raziskave vpliva povečanih talnih koncentracij geološkega plina na območju naravnih izvirov CO₂ Hartušov na endofitske glive – arbuskularne mikorizne (AM) glive in temne septirane endofitske glive (DSE – Dark Septated Endophytes) v koreninah rastlin vrste rušnata masnica, *Deschampsia caespitosa* (L.) PB., ki je na tem območju prisotna tako na kontrolnih lokacijah, kot tudi na lokacijah, ki so najbolj izpostavljene vplivom geološkega plina.

Naša hipoteza je bila, da bomo zasledili manjšo kolonizacijo korenin z AM in DSE glivami na ekstremnih lokacijah, kjer prihaja tudi do talne hipoksije, na katero so glive občutljive.

2 PREGLED OBJAV

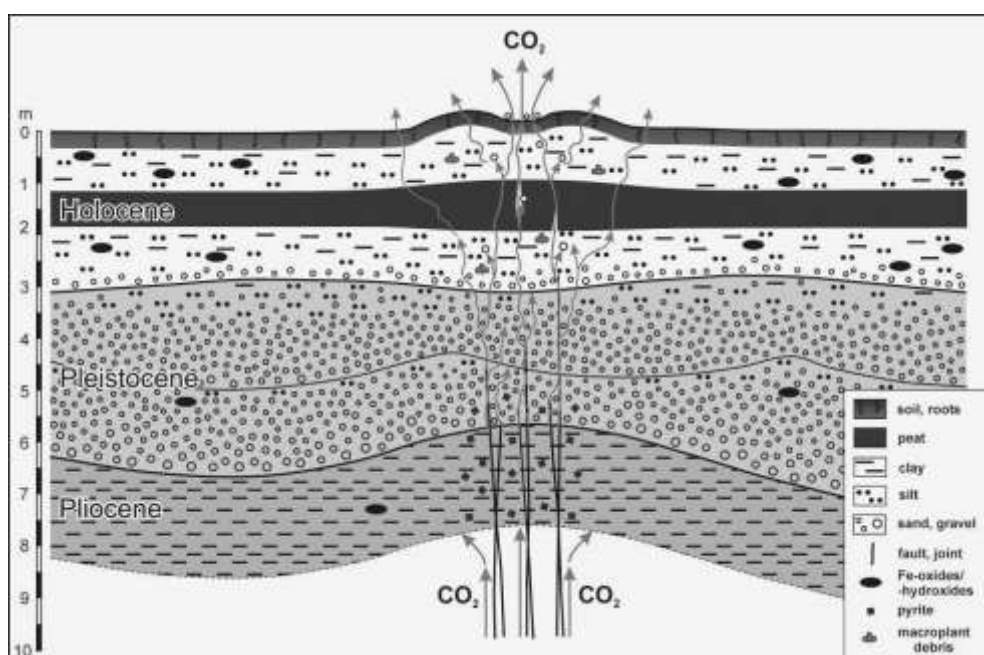
2.1 NARAVNI IZVIRI CO₂ (MOFETE)

Mofete predstavljajo območja z izhajanjem geološkega CO₂. Pogosto se pojavljajo v regijah kjer prevladujejo tektonska, magmatska in vulkanska aktivnost v zemeljski skorji. Ob vstopu plina na površino tal je njegovo izhajanje odvisno od geomorfologije in sezonskih vremenskih razmer. Ker je težji od zraka, ogljikov dioksid oblikuje plinske bazene v kotanjah, depresijah in dolinah. Na popolnoma miren dan se bodo tanke plasti geološkega plina oblikovale celo na ravninskih področjih. V nasprotnem primeru se bo plin izgubil v ozračju s konvekcijo in turbulenco (Pfanž in sod., 2004). Lokacije tovrstnih izvirov se pojavljajo na mestih vulkanske (tektonske) aktivnosti, podobno kot tudi sulfotare (žveplovi vreli) ali fumarole (vreli tople vode oz. vodne pare) v mnogih državah povsod po svetu. V Evropi lahko zasledimo naravne izvire CO₂ v Avstriji, Češki, Franciji, Grčiji, Islandiji, Italiji, Madžarski, Nemčiji, Portugalski, Romuniji, Sloveniji in Španiji (cit. po Maček, 2004). V začetku devetdesetih let so se pojavile prve objave o uporabnosti naravnih vrelcev CO₂ v Italiji za proučevanje dolgoročnih vplivov povečane koncentracije CO₂ na rastline.

Če so koncentracije talnega CO₂ dovolj velike in če je koncentracija kisika v tleh sočasno zelo majhna, bodo rastline zelo hitro propadle. Če vreli spremenijo svojo lokacijo ali če celo na novo nastanejo kot posledica potresa ali predvulkanskih nemirov, prisotni ekosistem lahko utрпи hude poškodbe. Tak primer se je zgodil v hribovju Mammoth v Kaliforniji, kjer je kot posledica potresnih sunkov geološki CO₂ izšel v gozd Caldera. V naslednjih tednih so skoraj vsa borova drevesa vrste *Pinus radiata* v tem specifičnem območju propadla (Farrar in sod., 1995). Avtorji navajajo, da je bilo propadanje gozda v povezavi z izhajanjem geološkega CO₂ izpod površja opaženo na različnih mestih na površini 400.000 m² JZ v dolini Long Valley Caldera (Sorey in sod., 1998; Hill in Prejean, 2005). Po več kot desetih letih je izhajanje plina ponehalo in nova rast bora se je začela (Pfanž in sod., 2008).

Naravni izviri (mofete) Hartušov se nahajajo na SZ Češke v okolici Cheba. Na območju mofet se sestava atmosfere razlikujeje kvalitativno in kvantitativno od tiste v tipičnih tleh (npr. večja koncentracije CO₂ in manjša koncentracija O₂). V zemeljskem plašču ujet geološki CO₂ prihaja na površje v obliki plina, posledica tega je povečana koncentracija talnega CO₂ v tleh, ki lahko dosega vrednosti nad 90 % CO₂. Izviri CO₂ so zanimivi in edinstveni življenjski habitati za rastlinske, živalske in mikrobne združbe, ki tvorijo naravna območja z visoko talno koncentracijo CO₂ in pogosto tudi povečano atmosfersko koncentracijo CO₂ tik nad tlemi. Na področju čeških mofet v dolini Plesná skrajni izpusti geološkega CO₂ vodijo do sprememb v razširjenosti lokalne flore in favne

(Saßmannshausen, 2010). Odvisno od toka CO₂ v tleh, obstajajo tudi območja, kjer živali ne morejo bivati v podtalju ali na površini tal (Russel in sod., 2011). V nasprotju, z izjemo na območju z ekstremno povečanim tokom CO₂, raste vegetacija. Združbe rastlin se v neposredni bližini vrelcev CO₂ razlikujejo od kontrolnih združb (Saßmannshausen, 2010). Za to ekstremno območje vrelcev geološkega CO₂ je značilen pojav mofetofilnih rastlinskih vrst, ki jih lahko uporabimo kot rastlinski bioindikator mofet (Pfanž in sod., 2004).



Slika1: Model naravnih vrelcev (mofet) Hartušov (Flechsig in sod., 2008)

Tla na območjih mofet so zelo specifična. Prihaja do kopičenja težko razgradljivih organskih snovi in zmanjšane mikrobne aktivnosti v tleh (Maček in sod., 2009). Pfanž in sod. (2008) poročajo o pozitivni povezavi med koncentracijo CO₂ v talnem zraku in C/N razmerjem v tleh. Visoka koncentracija CO₂ lahko povzroča zakisanje tal (cit po Jamnik, 2005) in hipoksične (anoksične) razmere (Vodnik in sod., 2009). V primeru, ko kisika sploh ni, govorimo o anoksiji. Mikrobne združbe, ki kolonizirajo jedro mofet morajo prenašati te ekstremne razmere (Maček in sod., 2009, Videmšek in sod., 2009; Maček in sod., 2011, 2012). Rastline, ki rastejo na omenjenem področju so verjetno sposobne anatomskih prilagoditev na dane razmere, npr. tvorbe nadomestnih, adventivnih korenin, obenem lahko kisik transportirajo do korenin preko specializiranih tkiv – aerenhimov (Videmšek in sod., 2009).

2.2 MIKORIZA

Mikoriza je sožitje ali simbioza rastlin in gliv. Izraz simbioza je prvi uvedel Frank (1877). Deary (1887) opisuje simbiozo kot mutualistični odnos med rastlino in glivo, kjer imata oba organizma korist. Mikorizo razdelimo na endotrofno (endomikorizo) in ektotrofno (ektomikorizo). Med endotrofno spada tudi arbuskularna mikoriza, ki sem jo proučeval v svoji diplomski nalogi. Pri endotrofni mikorizi hife gliv vstopajo v protoplaste celic primarne skorje vse do endoderma ne pa tudi do centralnega cilindra korenine. V ta tip mikorize uvrščamo še ohridejsko in erikoidno mikorizo. Pri ektotrofni mikorizi hife gliv ne prodrejo v protoplaste celic ampak med celicami v intercelularjih tvorijo Hartigovo mrežo. Na površini korenin se tvori tudi hifni plašč, ki je pri endotrofni mikorizi odsoten. Med endotrofno in ektotrofno mikorizo ločimo prehod, ki se imenuje ektendotrofna mikoriza. Ektendotrofno mikorizo razdelimo še na ektendomikorizo, arbutuidno in monotropoidno. Zanimivo je, da ista vrsta glive lahko tvori ektomikorizo na eni rastlini in ektendotrofno mikorizo na drugi rastlini (Smith in Read, 2008).

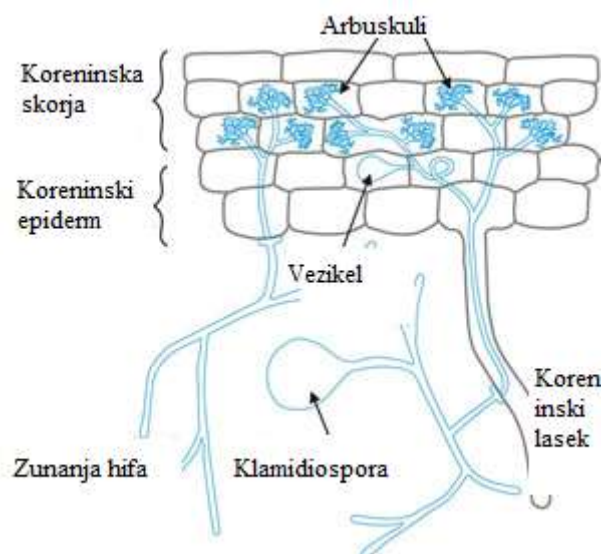
V predmetnem delu smo se osredotočili na endotrofno (arbuskularno mikorizo). To je simbioza rastlin in arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv. AM glive so obligatni simbioti, ki se jih ne da gojiti brez rastlinskega partnerja. Po novejših raziskavah AM glive tvorijo samostojno, monofiletsko debló Glomeromycota (Schußler in sod., 2001), ki je enakovredno drugima velikima debloma gliv Ascomycota in Basidiomycota. Arbuskularna mikoriza je najbolj pogosti tip mikorize v manjših nadmorskih višinah. Hife AM gliv prodirajo v korenine rastlin v zelo širokem obsegu različnih rastlinskih vrst in tipov. Med te spadajo kritosemenke, golosemenke ter predstavniki listnatih praproti, lisičjakovcev in mahov. Lahko rečemo da približno 95 % današnjih vrst rastlin pripada družinam, ki so mikorizne, vendar ne moremo reči, da je 95 % vseh vrst mikoriznih (Smith in Read, 2008). Arbuskularna mikoriza je najstarejši tip mikorize, t.i. mati vseh simbioz (Parniske, 2008). Ocenjujejo, da ja nastala pred več kot 400 milijoni let. Razvijala se je v času, ko so rastline prihajale na kopno in imela pomemben vpliv pri sprejemanju mineralnih hranil v rastline, saj prve kopenske rastline še niso imele pravih korenin ampak rizome. Kolonizacija gliv je bila dokazana v fosilnih najdbah iz časa devona pri rodovih rastlin *Aglaphyton* in *Asteroxylon*, kjer so prisotne podobne strukture (arbuskuli in vezikli) kot pri današnji skupini Glomeromycota. Kolonizacija korenin z glivami je močno prispevala k sprejemu mineralnih hranil v rastline (Smith in Read, 1997).

AM glive tvorijo v tleh omrežje nitastih hif, ki tvori zunaj-koreninski micelij. Hife na površini korenine tvorijo apresorije, preko katerih mehansko prodirajo v epidermalne celice korenin. Hife se nato razširijo na vse strani in tvorijo t.i. infekcijsko enoto. Pri arbuskularni mikorizi tvori gliva v koreninski skorji značilne morfološke strukture

arbuskule, včasih pa se tvorijo tudi vezikli. Arbuskul predstavljajo močno stanjšane in razvejane hife gliv, pri čemer se ustvari velika membranska površina, ki služi izmenjavi snovi med obema partnerjema v simbiozi. Potrjeno je, da poteka izmenjava fosfata med rastlino in glivo prav na tem mestu. Vezikli služijo shranjevanju rezervnih snovi. V njih lahko opazimo oljne kapljice (cit. po Maček in sod., 2009). Gliva se lahko razmnožuje s sporami, ki so pomembne tudi za klasično določevanje posameznih vrst (taksonov) in so taksonomski znak. Spore AM gliv so lahko velike tudi do nekaj sto µm in vsebujejo veliko število jeder ter lipidov in ogljikovih hidratov.

V letu 2011 je bilo objavljeno prvo poročilo o vplivu talne hipoksije na sestavo združbe AM gliv in na obočju mofet v Sloveniji (Maček in sod., 2011), prav tako je bila potrjena kolonizacija korenin z glivami (Maček in sod., 2011, 2012). Molekulske raziskave na slovenskih mofetah so potrdile prevlado dveh specifičnih taksonov AM gliv, prisotnih samo na območjih z ekstremno povečano koncentracijo CO₂ v tleh in močno spremenjeno in specifično sestavo združb AM gliv v hipoksičnih tleh (Maček in sod., 2011).

Podatkov o fiziološki vlogi AM gliv na območjih naravnih izvirov CO₂ ni. Maček in sod. (2011) poroča o manjši koncentraciji hranil (N, P) v rastlinah, ki so bile izpostavljene hipoksiji na območjih mofet. Ker so hife gliv za vsaj en velikostni red tanjše od korenin rastlin, bo za rastlino vedno ugodnejše pridobivanje hranil po simbiotski poti, kot pa z rastjo novih korenin (Fitter, 1991). AM glive, kot tudi druge glive, ki tvorijo micelije, lahko privzemajo hranila iz številnih prostorsko razpršenih lokacij, in jih nato preko micelija prenesejo na mesta, ki so za njihovo rast najbolj optimalna (Bago in sod., 2002). Hife AM gliv se razraščajo od rastline do rastline in oblikujejo t.i. mostove, preko katerih se premeščajo hranila in genski material (številna jedra). Mreža hif s sporami lahko preživi in vzdržuje infekcijsko enoto skozi neugodna obdobja, kadar je vegetacija v kateri tvori hife stara ali celo mrtva (Smith in Read, 1997). V aktivni simbiozi rastlina daje glivi potrebne organske snovi (sladkorje), gliva pa rastlino oskrbuje z minerali (fosfor, cink, baker, dušik) in izboljša preskrbo z vodo. Razvoj mikorize je odvisen od rastlinske vrste, AM gliv, tipa tal in od drugih abiotskih dejavnikov v okolju. Kolonizacija korenin z AM glivami poteka po naslednjih stopnjah: pred-kolonizacija, primarna kolonizacija, razpad arbuskulov, razširjanje kolonizacije znotraj korenin in v rizosferi, sekundarna kolonizacija in rast gliv v tleh (Smith in Read, 1997). Rastline z mikorizno kolonizacijo so odpornejše na težke kovine, različne patogene ter druge dejavnike stresa ter bolje izkoriščajo vodo in minerale, ki jih dobivajo od gliv.

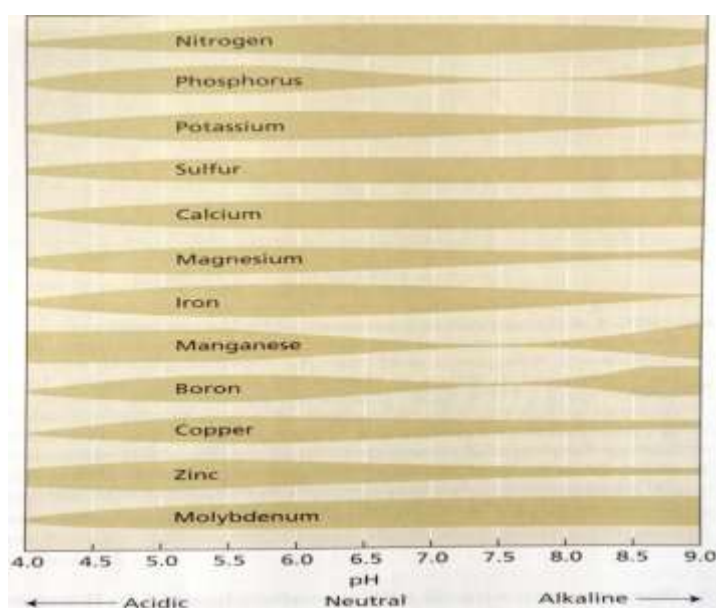


Slika 2: Slika predstavlja glavne morfološke značilnosti arbuskularne mikorize. Hife iz kalitvene spore kolonizirajo koreninske laske. Rastejo znotraj korenine med celicami koreninske skorje in vstopajo v celice, kjer tvorijo arbuskule ter vezikle (Moore in sod., 2011)

Znano je, da se 4 do 20 % neto fotosintetiziranega C v rastlini premešča v AM glive in uporablja za proizvodnjo vegetativnih in razmnoževalnih struktur AM gliv ter energetski metabolizem (dihanje), ki pomaga pri rasti in vzdrževanju glivne biomase, kot tudi pri izmenjavi hranil med rastlino in glivo (Smith in Read, 1997). V zameno gliva posreduje rastlini določene minerale. Posredni dokaz za to je v povečani rasti zunanjega micelija in produkciji spor. Biomasa gliv povezana s koreninami je bila ocenjena na 4 do 20 % teže korenin, vendar to ne vključuje zunanjih hif ali spor. V tem primeru bi bila biomasa še precej večja (Smith in Read, 1997).

Posreden dokaz, da so mikorizirane korenine bolj učinkovite pri črpanju hranil kot nemikorizirane korenine prihaja iz dejstva, da so mikorizirane rastline pogoste ne samo večje ampak tudi vsebujejo večjo koncentracijo fosforja v njihovih tkivih kot pa nekolonizirane kontrolne rastline. Sanders in Tinker (1971a, 1973b, cit. po Smith and Read, 1997) sta prva demonstrirala povečano količino fosforja v mikoriziranih koreninah pri čebuli (*Allium cepa*), kolonizirani z glivo *Glomus* sp. Njihovi podatki kažejo da so bile količine povprečno 3-4 krat večje kot v nemikoriziranih koreninah. Količina ter oblika fosforja v tleh in dejavniki, ki vplivajo na razpoložljivost fosforja so pomembni pri oblikovanju poti pri kateri mikorizna gliva vpliva na črpanje fosforja v rastline. Fosfor je v tleh v organski ter anorganski obliki (Smith and Read, 1997). Največji delež fosforja v tleh je v obliki anorganskih soli (fosfatov) in organskih spojin, ki so rastlinam dostopne šele po procesu preperevanja oziroma mineralizacije. Rastlinam dostopne oblike fosforja so le v obliki anionov, ki jih je v talni raztopini zelo malo. Fosfor je najbolj dostopen pri pH

vrednosti tal 6,5. Lokalne spremembe vrednosti pH v rizosferi lahko igrajo pomembno vlogo pri dostopnosti različnih oblik fosforja (Smith and Read, 1997). V močno kislih tleh je fosfor težko dostopen, ker se veže s prostimi železovimi in aluminijevimi kationi v netopne fosfate. Največjo vlogo pri črpanju fosforja v tleh imajo zunanjkoreninske hife AM gliv, ki tudi tekmujejo z mikroorganizmi za pravkar mineralizirani fosfor. Zaradi majhnega premera hife prodirajo skozi pore v zemlji ter tako povečajo volumen za boljšo izrabo hranil (Smith in Read, 1997).



Slika 3: Slika prikazuje vpliv talnega pH na dostopnost hranil v tleh. Širina osenčenih območij kaže stopnjo dostopnosti hranil rastlinskim koreninam. Vsa prikazana hranila so dostopna v območju talnega pH 5,5 – 6,5 (Taiz in Zeiger, 2010)

V rastlinah, ki so bile kolonizirane z AM glivami, je bila prav tako opazna povečana koncentracija dušika. Koncentracija dušika v rastlini je približno 10x večja kot koncentracija fosforja. Tukaj ni direktnega dokaza, da bi bile zunanje hife direktno povezane z mineralizacijo dušika v organski obliki. Dokazano je, da so AM glive vključene v črpanje in prenos anorganskega dušika. Najbolj pomembni obliki za rastlino, prav tako za AM glive sta (NO₃⁻) in (NH₄⁺). V obdelani zemlji (NO₃⁻) ponavadi prevlada zaradi nitrifikacije (NH₄⁺) (Smith in Read, 1997).

Biološke aktivnosti v tleh so znane in igrajo pomembno vlogo pri kroženju hranil in vplivu na strukturo tal. Večina poročil o vplivu mikorize na kmetijstvo poroča o koristih, z izjemo nekaterih poročil, kjer poročajo o manjši rasti na polju ob prisotnosti mikoriznih gliv. Dokazano je, da mikorizne glive prispevajo k povečanju pridelka in pomembno vplivajo pri tem, kako se pridelek odziva na gnojenje in spremembe v okolju (npr. sušni stres), vplivajo pa tudi na izboljšanje strukture tal s stabilizacijo talnih agregatov (Maček in

Vodnik, 2005). Potencial za uporabo AM gliv v kmetijski praksi je največji na območjih s sonaravnim kmetijstvom.

2.3 TEMNE SEPTIRANE ENDOFITSKE GLIVE

V diplomski nalogi sem prav tako ocenjeval kolonizacijo korenin s temnimi septiranimi endofitskimi glivami (Dark Septated Endophytes ali DSE). Po naši vednosti, trenutno ni razpoložljivih podatkov o prisotnosti ali funkciji drugih skupin gliv, na primer DSE gliv, v koreninah rastlin, ki rastejo na območjih mofet. Te glive pogosto naselijo korenine v različnih ekosistemih, vendar njihov vpliv na rastline še ni povsem pojasnjen (Newsham, 2011).

DSE glive so opredeljene kot konidijski ali sterilni septirani glivni endofiti. V koreninah rastlin so vidne kot obarvane ali temno pigmentirane strukture, ki jih vidimo le z mikroskopom (Barrow, 2003). Melanizacija njihovih septiranih hif in mikrosklerocijev jim daje značilno temno barvo. Delujejo lahko kot patogeni ali saprofiti, kot tudi tvorijo mutualistične zveze kot pri mikorizi. Našli so jih povsod po svetu in pogosto sobivajo z različnimi mikoriznimi glivami. Potrjeno je, da so DSE glive najdene pri ca. 600 različnih rastlinskih vrstah, od tega tudi pri rastlinah, ki veljajo za nemikorizne (Jumpponen in Trappe, 1998). Prevladujejo v alpskih in arktičnih predelih in zato tam predstavljajo pomemben delež biomase. Kljub številnim opazovanjem teh gliv je zelo malo znanega o njihovi ekologiji, identiteti in učinku na rastlinskega partnerja (Schmidt, 2000). DSE glive ne izberejo določenega gostitelja specifično in so bile izolirane tudi iz rastlinskih vrst, ki veljajo za nemikorizne. Največ podatkov o razširjenosti DSE gliv je zbranih iz arktičnih, alpskih, antarktičnih in zmernih habitatov, glede razširjenosti DSE gliv v borealnih in tropskih ekosistemih ni dosti znanega (Mandyam in Jumpponen, 2005).

Read in Haselwandter (1981, cit. po Mandyam in Jumpponen, 2005) sta raziskovala kolonizacijo z koreninskimi endofiti pri najpogostejših rastlinah v centralnem in severnem delu avstrijskih Alp in zabeležila kolonizacijo z AM glivami, DSE glivami in ektomikoriznimi (EM) glivami v dveh različnih časovnih vzorčenjih in na petih lokacijah različne nadmorske višine. Zaključek je bil, da je več kot polovica rastlin imela tipično arbuskularno mikorizo, ena tretjina pa je bila kolonizirana z DSE glivami. Ugotovili so, da je kolonizacija z AM in DSE glivami povezana z nadmorsko višino. Prisotnost AM gliv v koreninah rastlin je bila najmanjša na največji višini, v nasprotju z DSE glivami, ki so kolonizirane rastline tudi na višini nad 3000 m (Mandyam in Jumpponen, 2005). To kaže, da DSE glive prevladujejo na višjih legah. Leta 2003 sta Trowbridge in Jumpponen objavila rezultate raziskav o kolonizaciji korenin vrbe (*Salix* spp.) z AM, EM in DSE glivami na območju umika ledenika v podalpski regiji Cascades Mountain Range v Washingtonu. Našli so manj kot 1% koloniziranih korenin rastlinskega gostitelja z AM

glivami, 25 % in 19 % z EM glivami ter 26 % kolonizacije z DSE glivami (Mandyam in Jumpponen, 2005). V zmernih habitatih sta Kovacs in Szigetvari (2002, cit. po Mandyam in Jumpponen, 2005) raziskovala kolonizacijo rastlin z DSE glivami na Madžarskem. To je prvi primer v katerem so predlagali, da je kolonizacija z DSE glivami enako razširjena kot tista z AM glivami. Ugotovila sta, da je bilo 67 % raziskovanih rastlin koloniziranih z AM glivami. V celoti so bile rastline kolonizirane z DSE glivami v enakem obsegu kot AM glive. Vse od 63 rastlinskih vrst so bile kolonizirane z DSE glivami. Barrow in Aaltonen (2001, cit. po Mandyam in Jumpponen, 2005) sta prav tako potrdila razširjenost DSE gliv v koreninah avtohtonih rastlinskih vrst v ravninskem delu New Mexica, ZDA. Vrsta študij je pokazala tudi pogosto kolonizacijo korenin rastlin z DSE glivami v ekstremnih okoljih, kot so npr. tla, onesnažena s težkimi kovinami (Regvar in sod., 2010).

Kljub temu, da so DSE glive, tako v ekološkem, kot tudi fiziološkem pogledu, dokaj nepoznane, sta dobro opisani dve ekološki značilnosti teh organizmov. Prvič, vse DSE glive imajo, vsaj v določenih življenskih fazah, temne, melanizirane hife. Predpostavljajo, da je melanizacija povezana s toleranco na stres, vendar do sedaj še ni točno ugotovljeno, kako okoljski dejavniki vplivajo na nastanek melaniziranih hif v primerjavi z nemelaniziranimi hifami. Drugič, DSE glive tvorijo znotrajkoreninske mikrosklerocije, ki naj bi služili za premostitev neugodnih okoljskih razmer kot razmnoževalne enote (Slika 4), vendar so tudi na tem področju podatki zelo omejeni (Ruotsalainen, 2007).

Zaenkrat ni objavljenih podatkov o prisotnosti DSE gliv na območjih mofet.

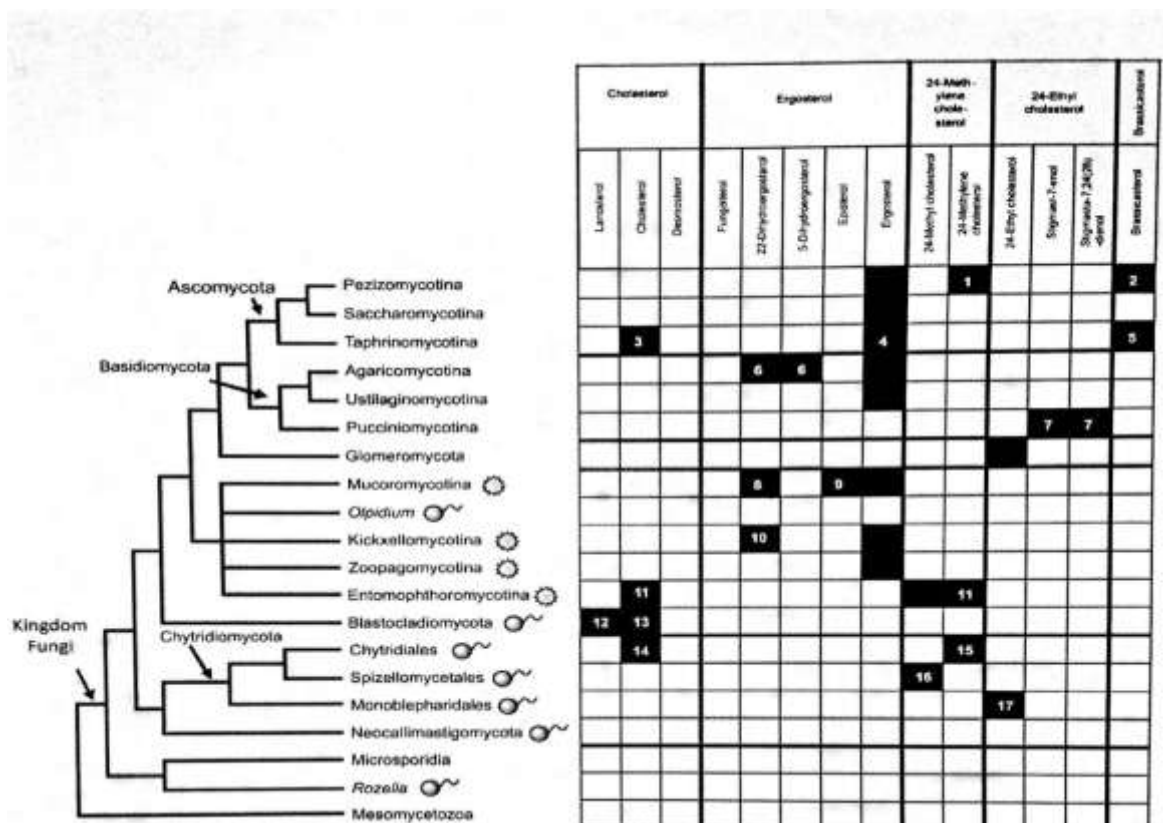
2.4 KVANTITATIVNO OCENJEVANJE PRISOTNOSTI ENDOFITSKIH GLIV V OKOLJU

Prisotnost arbuskularne mikorize so potrdili pri veliki večini rastlin (80 % oz. \approx 200.000 vrst). Poleg konvencionalnih pristopov (predvsem različne tehnike ocenjevanja deleža korenin, koloniziranih z glivami) se uporabljajo tudi molekulske tehnike, ki so omogočile vpogled v sestavo združb mikoriznih gliv v naravnih ekosistemih (Maček in sod., 2009). V svoji diplomski sem se osredotočil predvsem na konvencionalne pristope, med njimi je najbolj uporabljena metoda za ocenjevanje kolonizacije korenin z AM glivami (Trouvelot in sod., 1986) po predhodnji presvetlitvi korenin z lugom in obarvanju glivnih struktur ter mikroskopiranjem (podrobnejši opis metode je v poglavju Metode (str. 13,14)). Obstaja tudi več različnih metod za oceno količine zunajkoreninskega micelija AM gliv v substratu. V ta namen vzorce tal suspendiramo v vodi, suspenzijo filtriramo skozi membranski filter in hife gliv pobarvamo z barvilom. Dolžino hif izmerimo pod stereolupo npr. z linijsko intersekcijsko metodo (cit. po Maček, 2009). Slednjega postopka v okviru tega diplomskega dela nismo izvajali. Slaba stran večine metod za kvantifikacijo mikorize v okolju je predvsem ta, da so metode subjektivne in dopuščajo relativno veliko možnost

vpliva s strani ocenjevalca (izurjenost in izkušnost ocenjevalca, razlike med ocenami posameznikov).

Alternativa ocenam prisotnosti glivnega micelija v koreninah in tleh je uporaba nekaterih biokemijskih markerjev, ki načeloma veljajo za manj subjektivne (v sklopu diplome sicer niso bili obravnavani). Prva ocena o biomasi AM gliv v povezavi s koreninami je bila osnovana na določanju vsebine hitina v korenini. Hepper (1977, cit. po Smith in Read, 1997) je z meritvami koncentracije hitina ocenil suho težo gliv v korenini, ki se je gibala med 4 in 17 % skupne teže.

Ergosterol je bil prav tako omenjen kot kvantitativni kazalec za prisotnost AM gliv (Weete in sod., 2010), vendar se je kasneje izkazalo, da ni primeren marker za AM glive, ki so tudi sicer filogenetsko ločene od ostalih skupin gliv (ločeno monofiletsko deblo Glomeromycota). Steroli so sestavni del bioloških membran. Uravnavajo njeno fluidnost in trdnost in so prisotni pri vseh evkariontskih organizmih. Živalska celica vsebuje predvsem holesterol, rastlinska fitosterole (stigmasterol, sitosterol ali dezmosterol), glivna pa ergosterol, z nekaterimi izjemami, vključno z AM glivami (Weete in sod., 2010). Ergosterol so odkrili pred več kot 100 leti in ga šteli za glavni sterol gliv, vendar ni prisoten pri vseh skupinah gliv in napačna predstava je nastala zato, ker je bila večina gliv, ki so bile prvotno analizirane za vsebnost sterolov iz debel Ascomycota in Basidiomycota, pri katerih dejansko prevladuje ergosterol (Slika 4). Ergosterol je tako postal uveljavljen kot edini »sterol gliv«, ki je bil uporabljen kot kazalec za oceno biomase gliv v tleh in rastlinah. Vendar pa se je z nadaljnjimi raziskavami o razširitvi sterolov v kraljestvu gliv pokazalo, da situacija ni tako preprosta. Pri monofiletski skupini Glomeromycota, kamor sodijo vse AM glive je tako najbolj značilen sterol 24-etil holesterol, kar prikazuje tudi spodnja preglednica steroli gliv (slika 4).



Slika 4: Slika prikazuje filogenetsko drevo gliv in pojavljanje določenih sterolov pri posameznih taksonomskih skupinah. Ergosterola ni mogoče upoštevati kot edinega sterola gliv, ker obstajajo specifični taksonomski steroli, ki se ne pojavijo univerzalno, v celotnem kraljestvu gliv (Weete in sod., 2010)

Kot biokemijski marker je bila v preteklosti pogosta tudi uporaba fosfolipidnih maščobnih kislin (PLFA), ki prav tako predstavljajo eno glavnih komponent celičnih membran in naj bi bile (vsaj delno) specifične za posamezne skupine organizmov. Za arbuskularne mikorizne glive je v literaturi pogosto navedena uporaba maščobne kisline z oznako 16:1 ω 5. V pred kratkim objavljenem preglednem članku (Frostegård in sod., 2011) navajajo, da je potrebna previdnost pri uporabi PLFA za določanje biomase posameznih skupin organizmov, še toliko bolj v kompleksnem substratu, kot so tla. 16:1 ω 5 je pogosta kislina pri AM glivah, vendar jo najdemo tudi pri nekaterih bakterijah. Čeprav se kislina pogosto uporablja kot biokemijski marker za skupino AM gliv, je to zaradi sočasnega pojavljanja pri drugih organizmih vprašljivo. Avtorji preglednega članka zato opozarjajo na potrebno previdnost pri uporabi PLFA kot biomarkerjev za kvantifikacijo določene skupine organizmov v okolju. PLFA 16:1 ω 5 je tako lahko dober indikator AM gliv znotraj rastlinskih korenin, kjer je bakterijska biomasa relativno majhna, medtem ko za tla, z veliko biomaso bakterij, ne predstavlja ustreznega biomarkerja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 OPIS OBMOČJA IN VZORČENJE RASTLIN

Raziskovali smo del območja v dolini Plesná na severozahodu Češke, 19 km vzhodno od kraja Frantiskovy Lazne. Presečišče v dolžini ca 30 m je bilo določeno na ravnini, v tleh razvitih rečnih sedimentov iz holocena (Bankwitz in sod., 2003, cit. po T. Rennert in sod., 2011). Vzorčili in raziskovali smo na travniku, v katerem je vegetacija pokošena redno enkrat ali dvakrat letno (Rennert in sod., 2011). Vegetacija je precej heterogena, zaradi varirajoče sestave talne atmosfere in sestoji iz trajnih, negozdnih zelišč in trav združb *Valeriano – Filipenduletum*, *Arrhenateratalia* ali *Molinietalia*, odvisnih od količine podtalnice in prevladujočih talnih-plinskih razmer (Rennert in sod., 2011).

Na območju, kjer smo vzorčili korenine za raziskave prisotnosti arbuskularne mikorize 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 kislá. Dobro prenaša zmerno zasenčenost in jo zato najdemo razen na traviščih tudi v vlažnih gozdovih. Uspeva vse od nižin do alpinskega 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 %.

Rastline smo na območju naravnih izvirov CO₂ vzorčili na podlagi predhodnjih meritev koncentracij geološkega CO₂ v tleh v globini 20 cm (v razponu koncentracij med 0,3 in 99,9 % CO₂) (Slika 6). Vzorčili smo posamezne rastline rušnate masnice skupaj s tlemi (skupno 20 vzorcev), pri čemer smo za vsako posamezno lokacijo vzorčenja izmerili koncentracijo talnih plinov. Koncentracijo CO₂ v tleh smo merili s prenosnim analizatorjem plinov GA2000 (Ansyco, Nemčija). Plinski analizator GA2000 sočasno meri koncentracijo ogljikovega dioksida in metana (IR absorpcija) ter kisika (elektrokemična celica). Elektrokemično meri tudi ogljikov monoksid in vodikov sulfid, katerih koncentracije so izražene v ppm ($\mu\text{l plina l}^{-1}$ zraka). Na vsaki izbrani merilni točki smo za namen meritev koncentracije plinov s talno sondo izvrtali 20 cm globoko luknjo s premerom 2 cm. Takoj po vrtanju smo vanjo vstavili plastično cev analizatorja plinov, s katero smo lahko vsrkali talni zrak v aparaturó. Vrednosti koncentracij plinov smo odčitali, ko je bila dosežena maksimalna koncentracija CO₂ oz. minimalna koncentracija O₂ v tleh.

Korenine smo dobro oprali v vodi, polovico korenin smo shranili v 80 % etanolu za kasnejšo oceno stopnje kolonizacije korenin z AM in DSE glivami, ostanek korenin smo posušili in shranili za molekularno analizo združb AM gliv, kar ni bilo predmet tega diplomskega dela. Narejena je bila tudi pedološka analiza tal (na Biotehniški fakulteti, Oddelek za agronomijo, Center za pedologijo in varstvo okolja, Pedološki laboratorij) ter izmerjena višina vzorčenih rastlin (Pregl. 1 oz. Slika 7).



Slika 5: Prenosni analizator plinov GA 2000 (Ansyco, Nemčija)

3.2 BARVANJE KORENIN IN MIKROSKOPIRANJE

Korenine, ki so bile shranjene v alkoholu, smo sprali z vodo. Prelili smo jih z 10 % raztopino KOH in jih za 5-10 min. inkubirali pri temperaturi 90 °C (presvetljevanje korenin). Nato smo korenine sprali z vodo in dodali 0,05 % barvilo (tripan modro) v laktoglicerolu (280 ml deionizirane vode, 230 ml mlečne kisline in 445 ml glicerola) in epruvete inkubirali v sušilniku 15 min. pri 90 °C. Barvilo obarva hitin v celičnih stenah gliv. Ko so se epruvete ohladile smo odlili barvilo, korenine dobro sprali z vodo in pobarvane shranili v laktoglicerolu (raztopina za shranjevanje in odstranjevanje odvečnega barvila). Pri temperaturi 4 °C smo shranili vzorce za nadaljnjo oceno mikorizne kolonizacije korenin z mikroskopiranjem.

Za oceno kolonizacije korenin z AM glivami smo korenine pripravili po metodi, kot jo opisuje Trouvelot in sod. (1986), ki zahteva pregled preparata pod mikroskopom. Na

objektna stekelca smo razporedili manjše dele korenin (dolžine ca 1 cm), dodali kapljico laktoglicerola in pokrili preparat s krovnim stekelcem. Za vsak posamezen vzorec korenin smo pripravili po 3 preparate. Na vsak preparat smo položili 10 koreninic dolgih ca 1 cm, torej skupno 30 koreninic na posamezni vzorec. Ocenjevali smo več parametrov mikorizne kolonizacije: mikorizno kolonizacijo v razredih 0 %, <1 %, <10 %, <50 %, >50 % in >95 % ter gostoto arbuskulov v razredih nič, majhna, srednja in velika (glej prilogo A). Na podlagi takšnih ocen lahko izračunamo več različnih parametrov mikorizne kolonizacije: frekvenca delov korenin z glivo (F %), intenziteta mikorize (M %), intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin (m %), gostota arbuskulov v delih koreninske skorje z mikorizno kolonizacijo (a %), gostota arbuskulov v koreninskem sistemu (A %) (glej prilogo A).

Za izračun parametrov kolonizacije z AM smo uporabili naslednje formule:

Frekvenca delov korenin z glivo

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

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 = število fragmentov razvrščenih v razred 5

n_4 = število fragmentov razvrščenih v razred 4 itd.

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

Intenziteta mikorize v koloniziranih delih korenin

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

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

Gostota arbuskulov v delu korteksaz mikorizno kolonizacijo

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

kjer je:

$$mA_1 = [(95n_5A_1 + 70 n_4A_1 + 30n_3A_1 + 5n_2A_1 + n_1A_1) / \text{št.mikoriznih korenin}] * 100 / m$$

$n_1A_1, n_2A_1, \dots, n_5A_1$ = število fragmentov z gostoto arbuskulov v A_1 v posameznih razredih za mikorizno kolonizacijo. Isto velja za A_2 in A_3 .

a je gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo.

Gostota arbuskulov v koreninski skorji

$$A (\%) = a * (M / 100) \quad \dots(5)$$

A je gostota arbuskulov v koreninskem sistemu.

Za izračun zgoraj opisanih parametrov mikorizne kolonizacije smo si pomagali z računalniškim programom MycoCalc (Neumann in Tuinen, 2012).

Enak postopek smo uporabili tudi za izračun kolonizacije z DSE glivami. Pri DSE glivah smo ocenjevali samo parameter F (frekvenca delov korenin z glivo) in parameter M (intenziteta mikorize).

4 REZULTATI

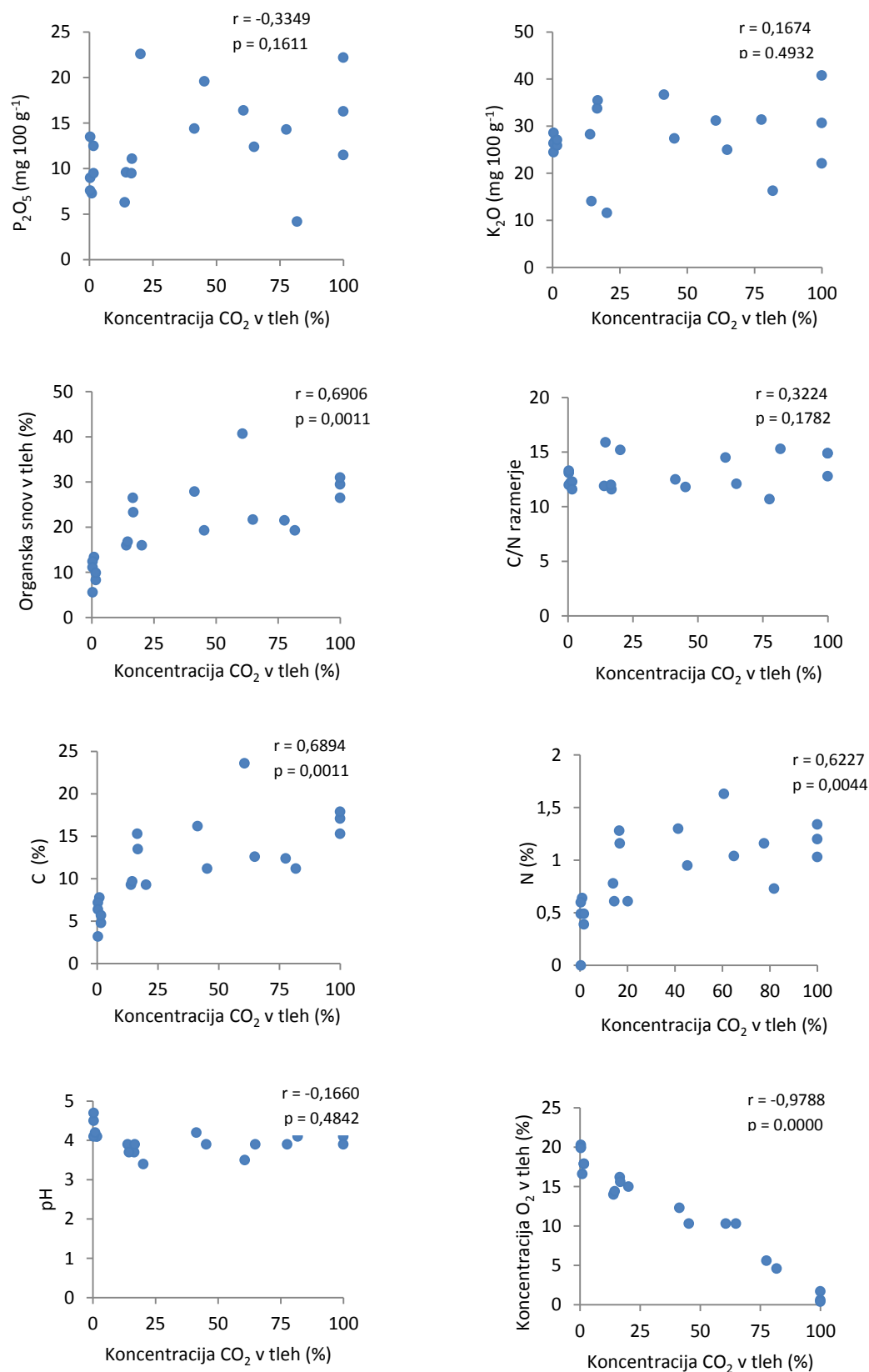
4.1 TALNI PARAMETRI

Preglednica 1: Talni parametri in značilnost povezave s talno koncentracijo CO₂. Vrednosti, ki so značilno povezane s koncentracijo talnih plinov, so označene odebeljeno.

Talni parametri	Povprečje ± SE	Povezava s koncentracijo CO ₂ (<i>p</i> vrednost)	Povezava s Koncentracijo CO ₂ (<i>r</i> vrednost)
C (%)	11,9 ± 1,1	0,0011	0,6894
Razmerje C/N	13,0 ± 0,3	0,1782	0,3224
K ₂ O (mg 100 g ⁻¹)	27,2 ± 1,7	0,4932	0,1674
P ₂ O ₅ (mg 100 g ⁻¹)	12,7 ± 1,1	0,1611	-0,3349
N (%)	0,9 ± 0,1	0,0044	0,6227
Organska snov (%)	20,6 ± 1,9	0,0011	0,6906
pH	4 ± 0,1	0,4842	-0,1660
Koncentracija O₂ v tleh (%)	12,2 ± 1,4	0,0000	-0,9788

Koncentracijo CO₂ v tleh in koncentracija O₂ v tleh sta statistično značilno negativno povezani. Med koncentracijo talnih plinov in talno vrednostjo pH nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Statistično značilne povezave so med koncentracijo CO₂ v tleh in naslednjimi talnimi parametri (organska snov v tleh, C, N, koncentracija O₂ v tleh). Med ostalimi parametri nismo ugotovili statistično značilnih razlik (Slika 6).

Slika prikazuje povezavo med koncentracijo CO₂ v tleh in različnimi talnimi parametri iz območja čeških mofet (C, N, razmerjem C/N, organsko snovjo v tleh, P₂O₅, K₂O, pH in koncentracijo O₂ v tleh). Vsaka točka predstavlja ločeno meritev za posamezen vzorec.

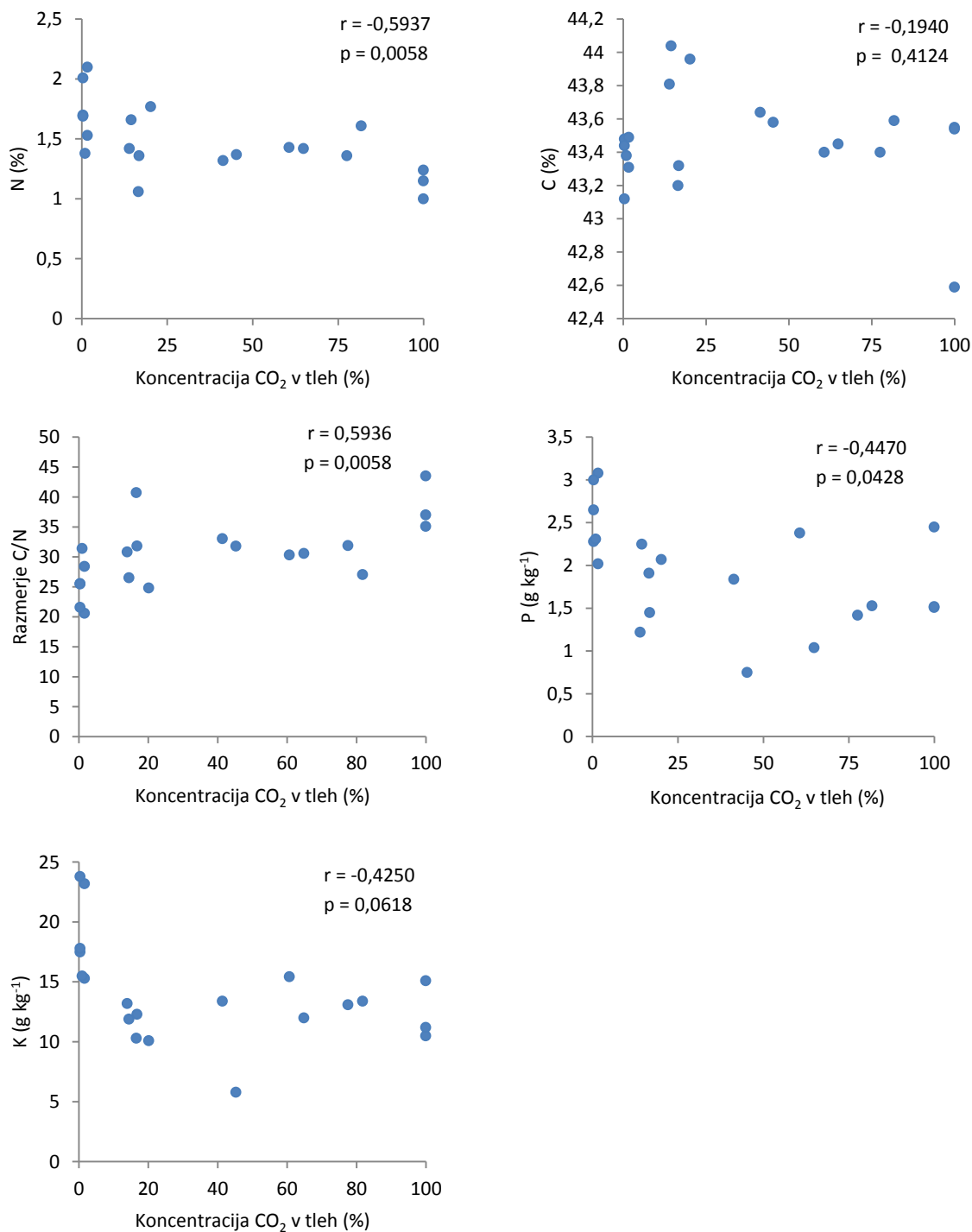


Slika 6: Povezava med koncentracijo CO₂ v tleh in različnimi talnimi parametri iz območja čeških mofet

4.2 KEMIJSKI PARAMETRI, MERJENI V NADZEMNIH DELIH RASTLIN

Preglednica 2: povprečje različnih kemijskih parametrov, merjenih v nadzemnih delih rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa*), in značilnost povezave s talno koncentracijo CO₂. Parametri, katerih vrednosti so značilno povezane s koncentracijo talnih plinov, so označeni odebeljeno.

Kemijski parametri	Povprečje ± SE	Povezava s koncentracijo CO ₂ (p)	Povezava s Koncentracijo CO ₂ (r)
C (%)	43,5 ± 0,1	0,4124	-0,1940
Razmerje C/N	30,4 ± 1,3	0,0058	0,5936
K (g kg ⁻¹)	14 ± 1,0	0,0618	-0,4250
P (g kg⁻¹)	1,9 ± 0,1	0,0482	-0,4470
N (%)	1,5 ± 0,1	0,0058	-0,5937

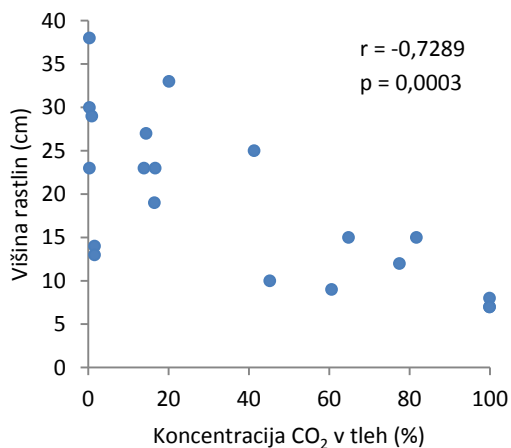


Slika 7: Slika nam prikazuje povezave med talno koncentracijo CO₂ in različnimi kemijskimi parametri, merjenimi v nadzemnih delih rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa*) iz območja čeških mofet (N, C, razmerje C/N, P, K,). Vsaka točka predstavlja ločeno meritev za posamezen vzorec.

Statistično značilna je bila povezava med koncentracijo talnega CO₂ in koncentracijo N, razmerjem C/N ter koncentracijo P v nadzemnih delih rastlin (Slika 7)

4.3 VIŠINA RASTLIN

Koncentracijo CO₂ v tleh in višina rastlin sta statistično značilno negativno povezani (Slika 8).



Slika 8: Slika nam prikazuje povezavo med koncentracijo CO₂ v tleh in višino rastlin vrste rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). Vsaka točka predstavlja ločeno meritev za posamezen vzorec oz. višino vegetacije na vzorčenem delu tal.

4.4 KOLONIZACIJA KORENIN Z AM IN DSE GLIVAMI

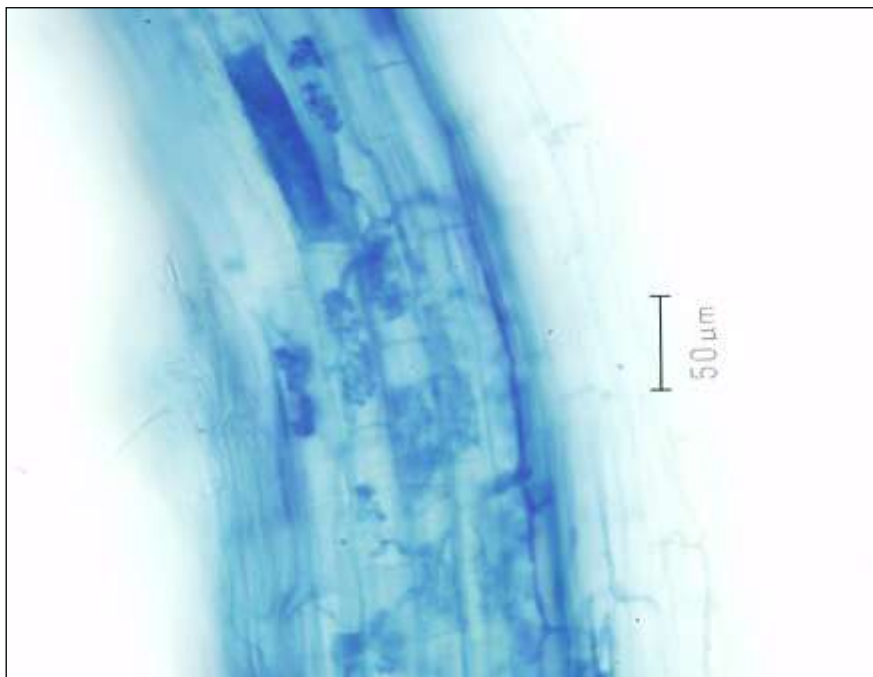
Frekvenca delov korenin z AM glivami (F) je bila relativno velika 81,4 %, z gostoto arbuskulov v delih korteksa z mikorizno kolonizacijo (a) 37,3 %, kar kaže na aktivno fiziološko izmenjavo hranil med rastlino in glivo tudi na rastiščih z največjo koncentracijo talnega CO₂.

Kolonizacijo korenin z DSE glivami smo izmerili v manjšem obsegu, s povprečno frekvenco delov korenin z DSE glivami (F) 32,5 % in majhno povprečno intenziteto kolonizacije v koloniziranih delih korenine (M = 6,2 %).

Preglednica 3: prikazuje povprečja parametrov kolonizacije korenin z AM in DSE glivami.

AMF	Povprečje ± SN
F	81,4 ± 4,9
M	32,7 ± 3,4
a	37,3 ± 3,5
A	13,4 ± 2,1
DSE	
F	32,5 ± 4,3
M	6,2 ± 1,2

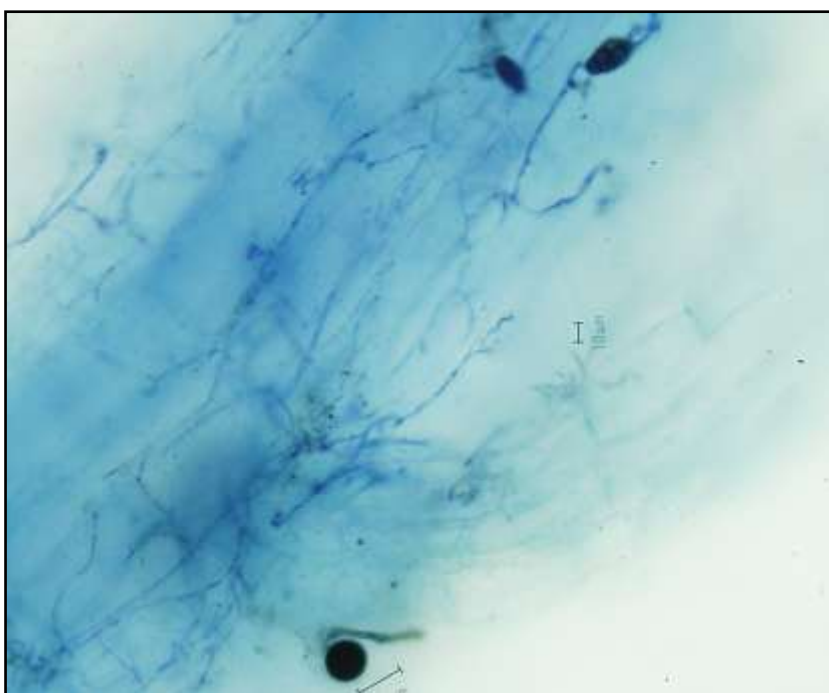
Kolonizacijo korenin z AM glivami smo potrdili na celotnem razponu koncentracij talnih plinov. Na spodnjih slikah je jasno razvidna tudi prisotnost arbuskulov v koreninah, kar nedvoumno potrjuje, da gre v tem primeru za kolonizacijo korenin z AM glivami (Slika 9 in 10) in ne kako drugo skupino endofitskih gliv.



Slika 9: Slika prikazuje kolonizacijo korenin vrste *Deschampsia caespitosa* (L.) PB., z AM glivami in značilne morfološke strukture (arbuskuli)

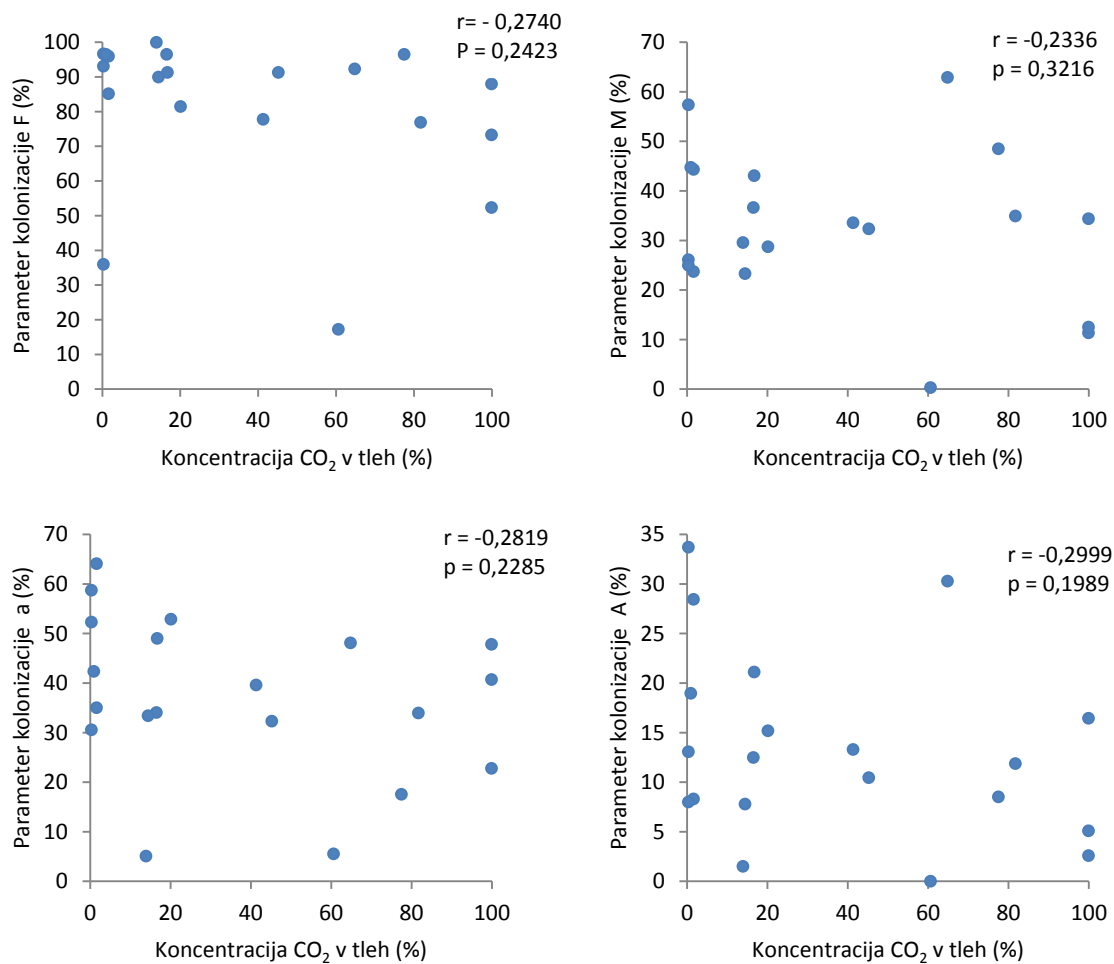


Slika 10: Slika prikazuje kolonizacijo korenin vrste *Deschampsia caespitosa* (L.) PB., z AM glivami in arbuskule



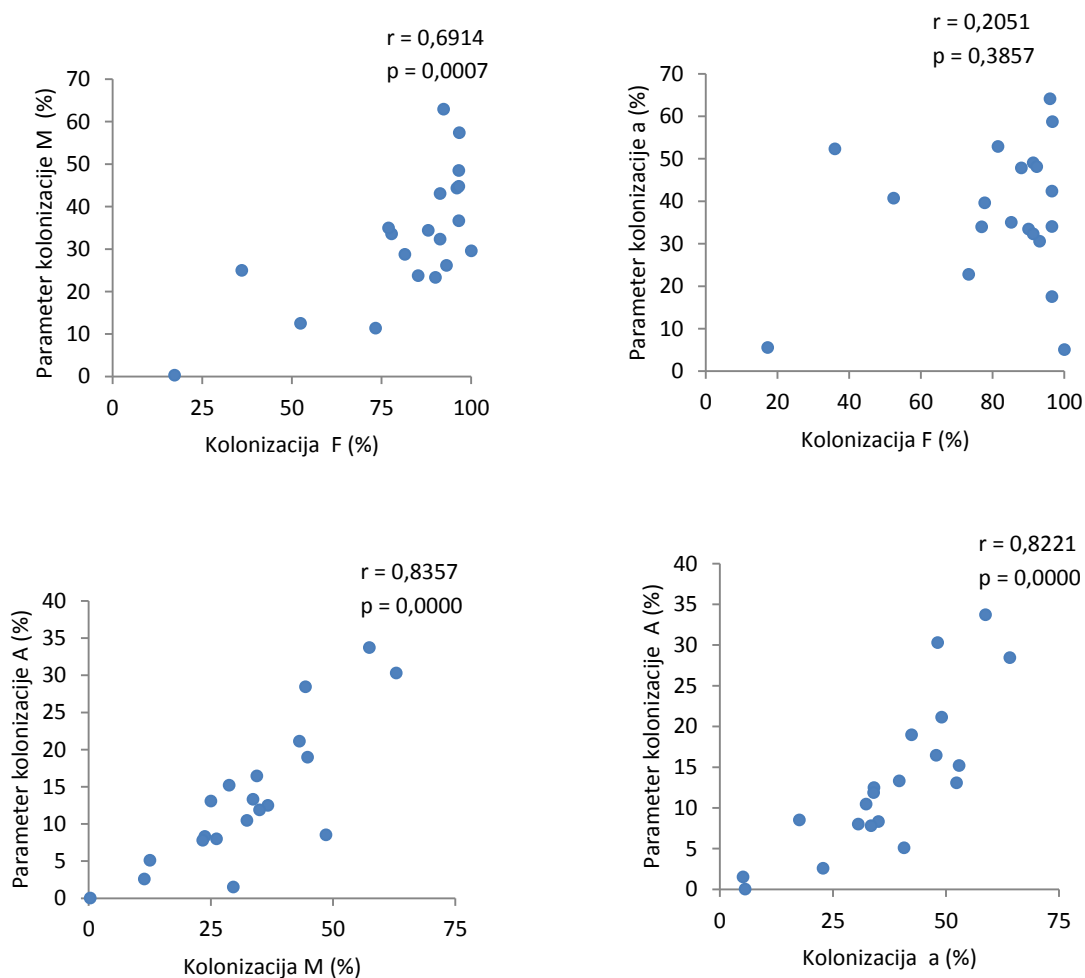
Slika 11: Na sliki so prikazane temne septirane endofitske (DSE) glive v korenini rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa*) (L.) PB., zgoraj desno je prikazan mikrosklerocij.

Med merjenimi parametri mikorizne kolonizacije in talno koncentracijo CO₂ ni bilo statistično značilne povezave.



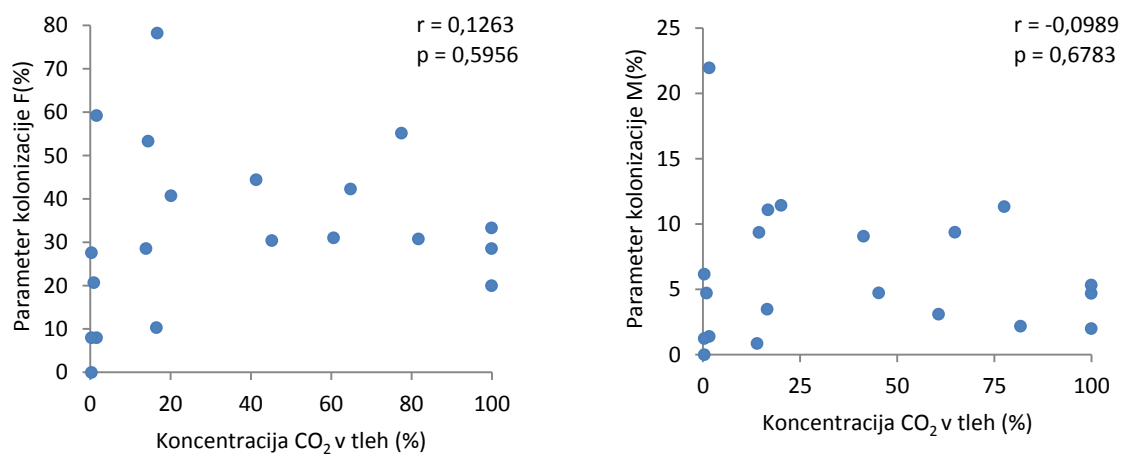
Slika 12: Slika nam prikazuje povezavo med koncentracijo CO₂ v tleh in različnimi parametri kolonizacije korenin z AM glivami: F (frekvenca delov korenin z glivo), M (intenziteta mikorize), a (gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo), A (gostota arbuskulov v koreninski skorji)

Med večino parametrov mikorizne kolonizacije smo ugotovili statistično značilno medsebojno povezavo, razen za parametra a in F (gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo ter frekvenca delov korenin z glivo) (slika 13).



Slika 13: Slika nam prikazuje povezavo med različnimi parametri kolonizacije z AM glivami. Opazili smo statistično značilne povezave med parametri kolonizacije: F (frekvenca delov korenin z glivo) in M (intenziteta mikorize), M in A (gostota arbuskulov v koreninski skorji) ter a (gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo) in A.

Pri DSE glivah smo ocenjevali samo parameter F (frekvenca delov korenin z glivo) in parameter M (intenziteta mikorize). Med merjenima parametroma kolonizacije z DSE glivami in koncentracijo CO₂ nismo opazili statistično značilnih povezav (slika 14).



Slika 14: Slika nam prikazuje povezavo med parametri kolonizacije z DSE glivami in koncentracijo CO₂ v tleh. Parameter kolonizacije F (frekvenca delov korenin z glivo) in parameter kolonizacije M (intenziteta kolonizacije)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi sem proučeval vpliv povečane koncentracije talnega CO₂ na območjih naravnih izvirov CO₂ (mofet) na kolonizacijo korenin rastlin z AM in DSE glivami. Raziskava je bila opravljena na mofetah (naravnih izvirov CO₂) na severozahodnem delu Češke na obstoječi vegetaciji, ki je bila izpostavljena ekstremnim razmeram daljše časovno obdobje. Vzorčili smo korenine rastline rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). Naša hipoteza je bila, da bomo zasledili manjšo kolonizacijo korenin z AM in DSE glivami na ekstremnih lokacijah, kjer prihaja tudi do talne hipoksije, na katero so glive občutljive.

V obstoječih raziskavah na naravnih izvirov CO₂ so se v veliki meri osredotočali predvsem na odzive vegetacije in nadzemnih delov rastlin na povečano koncentracijo CO₂, medtem ko je podzemni, rizosferni, del in odziv talnih mikroorganizmov ostal bolj ali manj neraziskan, z izjemo nekaterih raziskav na mofetah v Sloveniji (sestava združbe fiksatorjev CO₂; Videmšek in sod., 2009, sestava združbe in kolonizacija korenin z AM glivami; Maček in sod., 2011, 2012).

V globini 20 cm je koncentracija talnega CO₂ na območjih meritev znašala od 0,3 % do 99,9 % (Slika 6). Višina rastlin se je spreminjala glede na koncentracijo CO₂. V povprečju so bile rastline vrste rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.) visoke 19 cm, pri ekstremno veliki koncentraciji CO₂ (99,9 %) je bila višina rastlin minimalna, samo 7 cm, največja rast, maksimum 38 cm, je bila pri najnižji (kontrolni) koncentraciji CO₂ v tleh (0,3 %). Na podlagi tega, lahko sklepamo da je povečana koncentracija CO₂ vplivala na rast rastlin, kot je bilo že dokazano tudi v predhodnjih raziskavah (Vodnik in sod., 2007) na območju slovenskih mofet v Stavešincih in na drugih mofetah (Pfanž in sod., 2004).

Geološki CO₂ vpliva tudi na pH tal in redoks potencial, kar posledično vodi do manjše dostopnosti hranil (N, P, K) rastlinam. Na območju naših raziskav je bil talni pH v povprečju $4,0 \pm 0,1$. Vrednost pH ni bila statistično povezana s talno koncentracijo plinov (Slika 6). Fosfor je rastlinam najbolj dostopen pri pH 6,5, kar posledično pomeni manjšo dostopnost fosforja za rastline na območju naših raziskav. Na slovenskih naravnih izvirov CO₂ v Stavešincih so leta 2007 vzorčili 8 rastlinskih vrst, in sicer: sivozelena muhvič (*Setaria pumila*), navadna kostreba (*Echinochloa crus-galli*), navadno ločje (*Juncus effusus*), orjaška zlata rozga (*Solidago gigantea*), navadna pasja trava (*Dactylis glomerata*), travniška latovka (*Poa pratensis*), travniški mačji rep (*Phleum pratense*) in ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*) na dveh različnih mofetah, ki sta bili oddaljeni približno 40 m. V Stavešincih je bila količina fosforja v tleh občutno večja ($26,5 \pm 2,4$) pri visoki talni

koncentraciji CO₂ kot pri nižji talni koncentraciji ($4,8 \pm 0,3$). Kljub temu, so v tkivih večine vzorčenih vrst zasledili statistično značilno manjšo koncentracijo makroelementov (N in P), kot v kontrolnih ratstlinah, kar kaže na manjši privzem hranil pri rastlinah, ki rastejo v hipoksičnih razmerah. To velja predvsem za mofeto z največjimi izmerjenimi koncentracijami CO₂ v tleh (tudi do 99,9 %). Tudi pH je bil v tem primeru nizek, $3,8 \pm 0,0$ na območju z visoko talno koncentracijo CO₂ (Maček in sod., 2011).

V našem primeru (mofete Hartousov) je bila količina fosforja v tleh večja pri ekstremnih koncentracijah talnega CO₂, vendar razlike niso bile statistično značilne (slika 6). Koncentracija dušika v tleh je bila v našem primeru značilno večja ($p = 0,0044$) pri ekstremni koncentraciji CO₂ v tleh v primerjavi s kontrolo. Pri slovenskih mofetah se koncentracija N (%) v tleh ni bistveno razlikovala med različnimi izpostavitvami geološkemu plinu (Maček in sod., 2011).

Tudi v tej raziskavi smo ugotovili statistično značilno negativno povezavo med koncentracijo talnega CO₂ in koncentracijama N in P v nadzemnih delih rastlin vrste rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa*) (slika 7 oz. Preglednica 2). Na druge kemijske parametre (koncentracija K, C v nadzemnem delu rastlin) povečana talna koncentracija CO₂ ni imela vpliva (slika 7 oz. preglednica 2). Posledično lahko sklepamo, da talna hipoksija oz. povečana koncentracija CO₂ verjetno negativno vpliva na aktivni sprejem fosforja in dušika v rastlinske korenine. Prav tako lahko na manjšno dostopnost fosfatov in dušika vpliva nizka pH vrednost tal ($4,0 \pm 0,1$). V primeru mofet v Stavešincih so prišli do podobnih zaključkov glede kemijskih parametrov, ki so bili merjeni v nadzemnem delu rastlin v povezavi z talno koncentracijo CO₂ (Maček in sod., 2011).

5.1.1 Vpliv talne koncentracije CO₂ na mofetah na AM glive

Povečana koncentracija CO₂ ni značilno vplivala na kolonizacijo korenin z AM in DSE glivami, kar smo sicer pričakovali pred začetkom naših raziskav. Ugotovili smo, da je tudi pri ekstremnih izpostavitvah rastlin geološkemu plinu prisotna kolonizacija korenin z AM in DSE glivami.

Ugotovili smo, da je bila v koreninah vzorčenih rastlin F (frekvenca delov korenine z glivo) $81,4 \% \pm 4,9$ in M (inteziteta mikorize) $32,7 \% \pm 3,4$, kar pomeni, da je kolonizacija AM gliv v takšnih ekstremnih habitatih tudi prisotna v relativno velikem obsegu. Med različnimi parametri kolonizacije korenin z AM glivami in talno koncentracijo CO₂ nismo ugotovili statistično značilne povezave. Povprečna gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo (a) je bila $37,3 \% \pm 3,5$ in povprečna gostota arbuskulov v koreninski skorji (A) je bila $13,4 \% \pm 2,1$ kar kaže na fiziološko aktivno simbiozo.

Posledično lahko sklepamo, da je prihajalo do izmenjave hranil med rastlinskim partnerjem in AM glivami (arbuskuli kot indikator fiziološke aktivnosti). Če primerjamo naše rezultate z ugotovitvami o kolonizaciji korenin rastlin z AM glivami iz slovenskih mofet (Stavešinci)(Maček in sod., 2011, 2012) ugotovimo, da so avtorji raziskave pri osebkih rastlin vrste sivozeleni muhvič (*Setaria pumila*) ugotovili prisotno kolonizacijo korenin z AM glivami pri visoki talni koncentraciji CO₂ (nad 80 %), medtem ko ostale tri vrste navadna kostreba (*Echinochloa crus-galli*), navadno ločje (*Juncus effusus*), orjaška zlata rozga (*Solidago gigantea*) iz te mofete niso bile kolonizirane z AM glivami (Maček in sod., 2011). Na drugi, manj ekstremni lokaciji (mofeti) so bile kolonizirane vse štiri obravnavane rastlinske vrste, navadna pasja trava (*Dactylis glomerata*), travniška latovka (*Poa pratensis*), travniški mačji rep (*Phleum pratense*) in ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*) pri visoki talni koncentraciji CO₂ (Maček in sod., 2011), na kar kaže tudi že predhodna študija istih avtorjev (Maček in sod., 2012), v kateri pa posamezne rastlinske vrste niso bile obravnavane posamič, ampak so ocenjevali kolonizacijo z AM glivami v združenih vzorcih korenin travniških rastlin. Maček in sod. (2011) ugotavljajo zmanjšano kolonizacijo korenin z AM glivami pri visoki talni koncentraciji CO₂ v primerjavi s kontrolnimi vzorci pri nižji talni koncentraciji CO₂ pri vrstah sivozeleni muhvič (*Setaria pumila*), navadna kostreba (*Echinochloa crus-galli*), ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*) ter travniška latovka (*Poa pratensis*) v Stavešincih, medtem ko pri drugih vrstah navadno ločje (*Juncus effusus*), orjaška zlata rozga (*Solidago gigantea*), navadna pasja trava (*Dactylis glomerata*), travniški mačji rep (*Phleum pratense*) sprememba v kolonizaciji ni bila značilno različna oz. kolonizacije sploh ni bilo.

5.1.2 Vpliv CO₂ na DSE glive

Povprečna frekvenca delov korenin z DSE glivami je bila 32,3 % ± 4,3. V primerjavi z AM glivami je bil z DSE koloniziran bistveno manjši delež korenin (povprečna frekvenca delov korenin z AM glivo 81,4 % ± 4,9). Kljub temu lahko sklepamo, da njihova prisotnost kaže na sobivanje različnih endofitov v koreninah vzorčenih rastlin, kar je bilo že dokazano v prejšnjih študijah (Jumpponen in sod., 1998). Vloga DSE gliv v tem ekstremnem okolju ni poznana.

5.1.3 Zaključek

Tako na območju čeških mofet kot tudi pri slovenskih mofetah smo bili priča hipoksiji z majhno koncentracijo kisika v talnem zraku. V svojem diplomskem delu sem se osredotočili predvsem na konvencionalne pristope določevanja kolonizacije korenin AM gliv, ne pa tudi določevanje sestave združb in identifikacijo posameznih taksonomskih in fiklogenetskih skupin (vrste, rodovi, filotipi), ki jih je možno identificirati izključno z

uporabo molekularskih tehnik. V nedavnem članku so Maček in sod. (2011) ugotovili, da je za območje slovenskih mofet pri visoki koncentraciji talnega CO₂ značilna dominanca določenih specializiranih taksonov (filotipov) AM gliv, ki so razširjene samo na lokacijah z izjemno povečano koncentracijo CO₂. Podobne rezultate (vzorec v porazdelitvi taksonov AM gliv) pričakujemo tudi za češke mofete, vendar omenjene raziskave še niso bile objavljene (Maček, 2012).

Pomembno je tudi razumeti, da moramo pri našem konvencionalnem ocenjevanju stopnje kolonizacije korenin z AM in DSE glivami z mikroskopom upoštevati možnosti določenih odstopanj zaradi subjektivnosti ocenjevalca samega. Rezultati bi bili bolj primerljivi, če bi vzorce pod mikroskopom ocenjevalo več ocenjevalcev in med seboj primerjali ugotovitve oz. če bi to tehniko kombinirali še z drugimi pristopi (npr. meritvami koncentracije za posamezno skupino gliv specifičnih sterolov ali PLFA v koreninah rastlin). Pri meritvah je pomembno omeniti, da vzorčimo samo določen del korenin, ne pa celotnega koreninskega sistema, kolonizacija z AM glivami pa ni enotna in enakomerno porazdeljena po celotnem koreninskem sistemu ampak pogosto zelo točkovna. Možna alternativa za oceno biomase gliv v naših vzorcih bi bile biokemijske meritve (Weete in sod., 2010; Frostegård in sod., 2011), kar pa ni bilo izvedeno v obsegu te diplomske naloge.

5.2 SKLEPI

Koncentraciji CO₂ in O₂ v tleh sta statistično značilno negativno povezani. Največja izmerjena koncentracija CO₂ je bila 99,9 % kar sovпада z minimalno koncentracijo O₂ 0,3 %. Najmanjša izmerjena (kontrolna) vrednost v tleh je 0,3 % CO₂. Koncentracija O₂ v kontrolnih tleh je bila 20,3 %. Iz tega lahko sklepamo, da na območjih naravnih izvirov CO₂ prihaja do hipoksije v tleh (pomanjkanja kisika).

Ugotovili smo negativno povezavo med koncentracijo CO₂ v tleh in višino rastlin. Višina rastlin je tako lahko prvi in najbolj opazen indikator velikih koncentracij geološkega CO₂ v tleh, kar kaže na bližino mofet.

Ugotovili smo statistično značilno negativno povezavo med koncentracijo talnega CO₂ in koncentracijo N ter P v nadzemnih delih rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa*) (L.) PB.

Ugotovili smo statistično značilno pozitivno povezavo med koncentracijo talnega CO₂ in talnimi parametri (koncentracija organske snovi v tleh ter koncentraciji C in N). Med koncentracijo talnih plinov in talno vrednostjo pH ni bilo statistično značilne povezave. Povprečna vrednost pH na območju mofet na Češkem je bila $4,0 \pm 0,1$. Majhna vrednost pH ter talna hipoksija verjetno vplivata na dostopnost in sprejem hranil (fosforja in dušika) v rastline.

Kolonizacija korenin z AM in DSE glivami je bila prisotna na celotnem razponu koncentracij geološkega CO₂ in ni bila značilno povezana s koncentracijami talnih plinov. Pri AM glivah je bila gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo v povprečju (parameter a) $37,3 \pm 3,5$ % in gostota arbuskulov v koreninski skorji (parameter A) $13,4 \pm 2,1$ %. Arbuskuli so bili prisotni tudi na območjih s hipoksijo, kar kaže na fiziološko aktivno simbiozo med AM glivami in rastlinami in aktivno izmenjavo hranil. Povprečna frekvenca delov korenin z DSE glivami je bila $32,3 \pm 4,3$ %. Vloga DSE gliv v tem ekstremnem okolju ni poznana. Koncentracija CO₂ v tleh ni vplivala na koloniziranost korenin z DSE glivami.

6 POVZETEK

Arbuskularna mikoriza je splošno razširjena simbioza rastlin in arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv, kjer hife gliv vstopajo v koreninsko skorjo vse do endoderma. Temne septirane endofitske glive (DSE) so opredeljene kot temno pigmentirani, konidijski ali sterilni septirani glivni endofiti. Vpliv geološkega CO₂ in posledično talne hipoksije na endofitske glive – arbuskularne mikorizne (AM) glive in temne septirane endofitske glive (DSE) – smo proučevali na območju naravnih izvirov CO₂ (mofet) na severozahodnem delu Češke v okolici Cheba. Vzorčili smo korenine rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB), ki je bila prisotna tako na kontrolnih vzorčnih mestih kot tudi na lokacijah z visoko talno koncentracijo CO₂. Koncentracijo CO₂ v tleh smo merili s prenosnim analizatorjem plinov GA2000 in odčitali posamezne vrednosti, ki so segale od 0,3 (kontrola) do 99,9 % (velika koncentracija CO₂). Posledično je bila talna koncentracija kisika ponekod zelo majhna in je prihajalo do talne hipoksije. Koncentracija talnega O₂ se je gibala v razponu od 0,4 do 20,3 % (kontrola). Vzorce korenin smo ustrezno obdelali (presvetljevanje korenin s KOH in barvanje glivnega micelija z barvilom tripan modro) in ocenili različne parametre kolonizacije korenin z AM in DSE glivami pod mikroskopom. Ocenjevali smo naslednje parametre: F (frekvenca delov korenin z glivo), M (intenziteta mikorize), a (gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo) ter A (gostota arbuskulov v koreninski skorji). Podoben postopek smo uporabili tudi za oceno DSE gliv, vendar smo izračunali le dva parametra kolonizacije F (frekvenca delov korenin z glivo), M (intenziteta kolonizacije). Opravili smo tudi kemično analizo tal in nadzemnih delov rastlin. Ugotovili smo statistično značilno negativno povezavo med koncentracijo talnega CO₂ in koncentracijo N ter P v nadzemnih delih rušnate masnice (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.). Med talnimi parametri (koncentracija organske snovi v tleh ter koncentraciji C in N) in med talno koncentracijo CO₂ je bila statistično značilna pozitivna povezava. Med koncentracijo talnih plinov in talno vrednostjo pH ni bilo statistično značilne povezave. Ugotovili smo negativno povezavo med koncentracijo CO₂ v tleh in višino rastlin. Med koncentracijo talnih plinov in različnimi parametri mikorizne kolonizacije v koreninah vzorčenih rastlin ni bilo statistično značilne povezave. Frekvenca delov korenin z AM glivami je bila v povprečju $81,4 \pm 4,9$ %. Gostota arbuskulov v delu korteksa z mikorizno kolonizacijo je bila v povprečju $37,3 \pm 3,5$ % in gostota arbuskulov v koreninski skorji $13,4 \pm 2,1$ %. Arbuskuli so bili prisotni v koreninah tudi na območjih s talno hipoksijo, kar kaže na fiziološko aktivno simbiozo med AM glivami in rastlinami in aktivno izmenjavo hranil v takih razmerah. Povprečna frekvenca delov korenin z DSE glivami je bila $32,3 \pm 4,3$ %. Ugotovili smo, da povečana talna koncentracija CO₂ na območju čeških mofet ni vplivala na koloniziranost korenin z AM in DSE glivami pri vrsti rušnata masnica (*Deschampsia caespitosa* (L.) PB.).

7 VIRI

- Bago B., Pfeffer P. E., Zipfel W., Lammers P., Shachar-Hill Y. 2002. Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Metabolism and transport in AM fungi. Plant and Soil*, 244: 189-197
- Barrow J. 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, 13: 239-247
- Farrar C. D., Sorey M. L., Evans W. C., Howie J. F., Kerr B. D., Kennedy B. M., King C. Y., Southon J. R. 1995. Forest-killing diffuse CO₂ emission at Mammoth Mountain as a sign of magmatic unrest. *Nature*, 376: 675-678
- Fitter A. H. 1991. Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions. *Experientia*, 47: 350-355
- Flehsig C., Bussert R., Rechner J., Schütze C., Kämpf H., 2008. The Hartoušov mofette field in the Cheb Basin, Western Eger Rift (Czech Republic): a comparative geoelectric, sedimentologic and soil gas study of a magmatic diffuse degassing structure. *Zeitschrift für Geologische Wissenschaften*, 36 3: 177-193
- Frostegård A., Baath E., Tunlid A. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1621-1625
- 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.
- Jumpponen A., Trappe M. J. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative Biotrophic root-colonizing fungi. Department of Forest Science, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331-7501, USA. *New Phytologist*, 140: 295-310
- 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. 2008. Molekulski pristopi pri raziskavah arbuskularne mikorize. 2009. *Acta agriculturae Slovenica*, 93 : 77-85

- Maček I. 2012. "raziskave o češki mofeti". Ljubljana, Biotehniška fakulteta (osebni vir, sep. 2012)
- Maček I., Vodnik D. 2005. Glomalin, lepilo strukturnih agregatov in pomembna sestavina organske snovi tal. *Proteus*, 67, 6: 244-251
- Maček I., Pfanc H., Francetič V., Batič F., Vodnik D. 2005. Root respiration 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., Dumbrell J. A., Nelson M., Fitter H. A., 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
- Mandyam K., Jumpponen A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53:173–189
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 2007. Mala flora Slovenije. Četrta izdaja. Slovenija, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Moore D., David Moore's World of Fungi: where mycology starts. 2011. http://www.davidmoore.org.uk/Assets/Mostly_Mycology/Diane_Howarth/am.htm (5. feb. 2012)
- Neumann E., Tuinen D. Mycocalc. <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Intro/Intropage.html> (10. feb. 2012)
- Newsham KK. 2011. A metaanalysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190: 783-793

- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 763-775
- Pfanz H., Vodnik D., Wittmann C., Aschan G., Raschi A. 2004. Plants and geothermal CO₂ exhalations – survival in and adaptation to a high CO₂ environment. *Progress in Botany*, 65: 499-538
- Pfanz H., Kämpf H., Mangelsdorf K. 2008. Botanische und organisch isotopengeochemische Charakterisierung von trockenen CO₂-Gasaustritten (Mofetten) im Bereich der seismisch aktiven Počátky-Plesna-Bruchstörungszone. DFG-Abschlußbericht zu PF 273/5, KA 902/10: 32 str.
<http://gepris.dfg.de/gepris/OCTOPUS/;jsessionid=5DAED090AE99C11B024B06FB8E6220E3?context=projekt&id=50583252&language=en&module=gepris&selectedSubTab=2&task=showDetail> (10. mar. 2012)
- Regvar M., Likar M., Piltaver A., Kugonič N., Smith J.E. 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant and Soil*, 330: 345–356
- Rennert 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
- Rillig M.C., Hernandez G.Y., Newton C. D., 2000. Arbuscular mycorrhizae respond to elevated atmospheric CO₂ after long-term exposure: evidence from a CO₂ spring in New Zealand supports the resource balance model. *Ecology Letters*, 3: 475-478
- Russell J. D., Schulz J.H., Hohberg K., Pfanz H. 2011. Occurrence of collembolan fauna in mofette fields (natural carbondioxide springs) of the Czech Republic. *Soil Organisms*, 83, 3: 489-505
- Ruotsalainen AL., Markkola A., Kozlov MV. 2007. Root fungal colonization in *Deschampsia flexuosa*: effects of pollution and neighbouring trees. *Environmental Pollution*, 147: 723–728
- Saßmannshausen F. 2010. Vegetationsökologische Charakterisierung terrestrischer Mofettenstandorte 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.

- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105: 1413-1421
- Schmidt K. S., Mullen B. R., Schadt W. C. 2000. Isolation and phylogenetic identification of a dark-septate fungus associated with the alpine plant *Ranunculus adoneus*. *New Phytologist*, 150: 747- 755
- Smith S. E., Read J. D., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second Edition. London, Academic Press: 605 str.
- Smith S. E., Read D., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Third Edition. London, Academic Press: 787 str.
- Sorey., M. L., Evans. W. C., Kennedy. B. M., Farrar. C. D., Hainsworth. L. J., Hausback. B. 1998. Carbon dioxide and helium emissions from a reservoir of magmatic gas beneath Mammoth Mountain, California. *Journal of Geophysical Research*, 103: 15303-15323
- Taiz L., Zeiger E., 2012. *Plant Physiology*. Fifth Edition. Sunderland. Massachusetts U.S.A. Sinauer Associates: 782 str.
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. V: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds.). Pariz, INRA Press: 217-221
- Videmšek U. 2009. Tok geogenega CO₂ iz tal ter mikrobna aktivnost in struktura mikrobne združbe v travniških tleh na območju mofete stavešinci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo: 100 str.
- 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
- Vodnik D., Kastelec D., Pfanz 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., Maček I., Videmšek U., Hladnik J. 2007. The life of plants under extreme CO₂.
Acta biologica Slovenica, 50, 1: 31-39

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

Weete D. J., Abril M., Blackwell M. 2010. Phylogenetic distribution of fungal sterols.
PLoS ONE, 5, 5: e10899 doi:10.1371/journal.pone.0010899 www.plosone.org
(5.mar.2012)

ZAHVALA

Zahvaljujem se:

Mentorici doc. dr. Ireni Maček za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

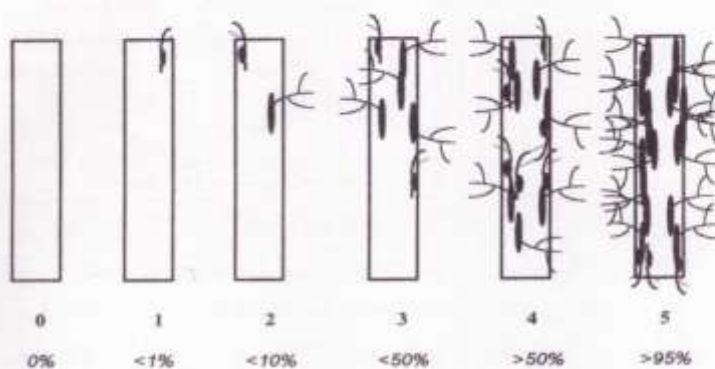
Vsem sošolkam in sošolcem za pozitivno energijo ter nepozabno druženje.

Zahvaljujem se tudi moji družini, ki me je podpirala in spodbujala skozi vsa leta med študijem.

PRILOGA A

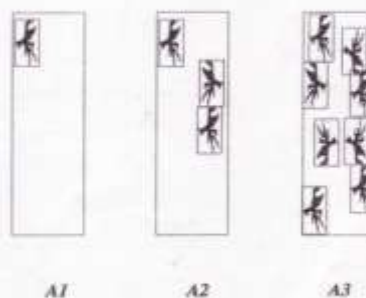
Ocenjevalni list

MIKORIZNA KOLONIZACIJA (6 RAZREDOV)



GOSTOTA ARBUSKULOV

nič : A0
majhna : A1
srednja : A2
velika : A3



Datum :
 Substrat :
 Rastlina :
 Gljiva :
 Tretma :
 Št. lista :

F% =
 M% =
 m% =
 a% =
 A% =

Opombe	1			2			3			4			5			V
	A3	A1	A0	A3	A2	A1	A0	A3	A2	A1	A0	A3	A2	A1	A0	
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																
19																
20																
21																
22																
23																
24																
25																
26																
27																
28																
29																
30																

1. PREGLED
 2. PREGLED
 5. PREGLED

Kosi B. Vpliv hipoksije in povečane koncentracije CO₂ na arbuskularno mikorizo.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2012.
