

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andrej KRAMAR

**OPTIMIZACIJA VZGOJE NAVADNEGA OSOČNIKA
(*SALICORNIA EUROPAEA*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Andrej KRAMAR

**OPTIMIZACIJA VZGOJE NAVADNEGA OSOČNIKA (*SALICORNIA
EUROPAEA*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

CULTIVATION OPTIMIZATION OF *SALICORNIA EUROPAEA*

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomska naloga je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljena je bila na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je bila izvedena tudi večina poskusov.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Marjano Regvar, za somentorja je bil imenovan dr. Matevž Likar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Simona Strgulc Krajšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alenka Gaberščik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Matevž Likar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andrej KRAMAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.13:581.526.52(043.2)=163.6
KG	slanost/halofiti/ <i>Salicornia</i> /kalitev/NaCl/rast/mikoriza/ <i>Fusarium</i>
AV	KRAMAR, Andrej
SA	REGVAR, Marjana (mentorica)/LIKAR Matevž (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	OPTIMIZACIJA VZGOJE NAVADNEGA OSOČNIKA (<i>SALICORNIA EUROPAEA</i>)
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 54 str., 2 pregl., 12 sl., 73 vir
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Visoke koncentracije soli v tleh so velik problem kmetijskih površin. Z vzgojo rastlin kot je navadni osočnik, ki uspešno raste na slanih površinah, bi lahko izkoristili trenutno neizkoriščene zemeljske površine. Namen raziskave je bil ugotoviti načine za najboljšo kalitev in rast navadnega osočnika. V ta namen smo testirali kaljivost velikih in malih semen osočnika v različnih sezonah. Velika semena so bolje kalila od majhnih, kar je v skladu z literaturo. Semena sezone 2007/08 so najboljše kalila zgodaj spomladi. Pri vzgoji kalic je na njihovo rast najboljše vplival prehod kalic iz 0 na 3 % koncentracijo NaCl. S tem smo dokazali pomembnost NaCl za rast osočnika. Vpliv glivnih izolatov na rast smo ugotavljali z inokulacijo v laboratoriju vzgojenih kalic z DB169, DB170 ter DB171, najdenih pri koreninah osočnika v naravi. Pred inokulacijo smo izolate identificirali s sekvenciranjem ITS regije. Ugotovili smo, da so naši izolati sorodni glivam rodu <i>Fusarium</i> . Od vseh izolatov se je le DB169 izkazal za koristnega, saj so kalice s tem inokulatom bolje rasle od kontrole. Ta izolat se je izkazal za tolerantnega na višje koncentracije NaCl, saj je na PDA gojišču z dodanim 5 % NaCl njegova rast ostala visoka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 581.13:581.526.52(043.2)=163.6

CX salinity/halophytes/*Salicornia*/germination/NaCl/growth/mycorrhiza/*Fusarium*

AU KRAMAR, Andrej

AA REGVAR, Marjana (supervisor)/LIKAR Matevž (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2011

TI CULTIVATION OPTIMIZATION OF *SALICORNIA EUROPAEA*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XII, 54 p., 2 tab., 12 fig., 73 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Salinity is a major problem of modern agriculture. The cultivation of plants that successfully thrive high salinity habitats, like *Salicornia europaea*, could be used for phytoremediation of degraded or saline lands. In this research we tried to find positive effects of different factors on germination and growth of *Salicornia*. For this purpose we tested the germination of large and small seeds of *Salicornia* through different seasons. Larger seeds had better germination rate than small seeds which coincide with literature data. Germination of 2007/08 seeds was highest in early spring. The importance of NaCl for growth of *Salicornia* was best shown when we put seedlings of *Salicornia* from treatment with 0 to 3 % NaCl. We inoculated seedlings of *Salicornia*, that we cultivated in the laboratory, with fungi DB169, DB170 and DB171, that were found on *Salicornia* roots in nature. Before inoculating fungi we identified them by sequencing their ITS region. We found out that our fungi are related to *Fusarium*. Seedlings of *Salicornia* had shown positive results of growth only if inoculated with DB169. Growth of DB169 was high even on PDA medium with 5 % NaCl showing good tolerance on salt.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
SLOVARČEK.....	XII
UVOD	1
1.1 Opredelitev problema.....	1
1.2 Namen in hipoteze.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 Sečoveljske soline kot slano rastišče.....	4
2.2 Halofiti	5
2.2.1 Splošno o halofitih	5
2.2.2 Navadni osočnik.....	5
2.2.2.1 Opis navadnega osočnika.....	5
2.2.2.2 Razširjenost osočnika.....	6
2.2.2.3 Združba in razporeditev osočnika	6
2.2.2.4 Življenjski cikel osočnika.....	7
2.3 Vplivi okolja na življenjski cikel rastlin na slanih rastiščih.....	7
2.3.1 Kalitev v slanem okolju.....	7
2.3.1.1 Obdobje kalitve	8
2.3.1.2 Vpliv interakcije temperature in slanosti na kalitev.....	8
2.3.1.3 Vpliv različnih soli na kalitev	8
2.3.1.4 Zaščita semen pred povečano koncentracijo soli	9
2.3.1.5 Vpliv shranjevanja in dormance.....	9

2.3.1.6	Pomen dimorfnih semen za kalitev osočnika.....	9
2.3.2	Rast rastlin v slanem okolju	10
2.3.2.1	Prilagoditve rastlin na slanih rastiščih.....	10
2.3.2.2	Osmotsko uravnavanje v celici ter pomen ionov pri halofitih	11
2.3.2.3	Strupenost ionov in njihovo izločanje.....	12
2.3.3	Glivni endofiti in njihov vpliv v slanem okolju	13
2.3.3.1	Splošno o endofitih.....	13
2.3.3.2	Mikoriza v slanem okolju.....	13
2.3.3.3	Mikoriza pri osočniku	14
3	MATERIALI IN METODE DELO	15
3.1	Materiali	15
3.1.1	Rastlinski in glivni material	15
3.1.2	Sestava raztopin.....	15
3.1.2.1	Hoaglandova raztopina.....	15
3.1.2.2	Sestava barvila Tripan modro	16
3.2	Metode dela	16
3.2.1	Izolacija, identifikacija in toleranca glivnih endofitov osočnika	16
3.2.1.1	Izolacija glivnih endofitov	16
3.2.1.2	Identifikacija glivnih endofitov	17
3.2.1.2.1	Izolacija in pomnožitev glivne DNA	17
3.2.1.2.2	Sekvenciranje in filogenetske analize	18
3.2.1.3	Toleranca glivnih izolatov na slanost.....	18
3.2.2	Kalitev in rast kalic	18
3.2.2.1	Nabiranje semen osočnika.....	18
3.2.2.2	Površinska sterilizacija semen.....	18
3.2.2.3	Kalitev	19
3.2.2.3.1	Vpliv dolžine shranjevanja na kalitev semen	19
3.2.2.3.2	Vpliv velikosti semen na kalitev	19
3.2.2.3.3	Sezonska dinamika kalitve	19

3.2.2.3.4	Vpliv temperature shranjevanja na kalitev semen.....	19
3.2.2.4	Vpliv slanosti na rast kalic	20
3.2.3	Inokulacija osočnika z glivnimi endofiti.....	20
3.2.3.1	Inokulacija osočnika.....	20
3.2.3.2	Barvanje korenin za pregled znakov glivne infekcije	21
3.3	Statistična obdelava podatkov	21
4	REZULTATI.....	22
4.1	Endofiti.....	22
4.1.1	Uspešnost izolacije.....	22
4.1.2	Identifikacija in določitev DNA sekvenc:.....	22
4.1.3	Toleranca izolatov na slanost	23
4.2	Kalitev	26
4.2.1	Načini sterilizacije semen pred kalitvijo	26
4.2.2	Vpliv dolžine shranjevanja na kalitev semen.....	27
4.2.3	Vpliv velikosti semen na kalitev	28
4.2.3.1	Sezonska dinamika kalitve:.....	30
4.2.4	Vpliv temperature shranjevanja na kalitev semen.....	31
4.3	Rast kalic	32
4.3.1	Rast kalic v petrijevkah	32
4.3.2	Vpliv dodatka soli na rast kalic v posodah.....	32
4.4	Prirastki inokuliranih kalic	35
4.4.1	Vpliv inokuliranih izolatov na spremembo mase poganjkov in korenin	36
4.4.2	Pregled znakov glivne infekcije:.....	37
5	DISKUSIJA	38
5.1	Endofiti.....	38
5.1.1	Identifikacija in določitev DNA sekvenc	38
5.1.2	Toleranca izolatov na slanost	38
5.2	Kalitev	39
5.2.1	Način sterilizacije	39

5.2.2	Vpliv dolžine shranjevanja na kalitev semen	39
5.2.3	Vpliv velikosti semen na kalitev	40
5.2.4	Sezonska dinamika kalitve	40
5.2.5	Vpliv temperature shranjevanja na kalitev semen.....	41
5.3	Vpliv slanosti na rast in razvoj kalic	42
5.4	Prirastki inokuliranih kalic	43
5.4.1	Pregled znakov glivne infekcije	44
6	SKLEPI.....	45
7	POVZETEK.....	46
8	VIRI	47

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: potek PCR postopka	17
Tabela 2: različni načini sterilizacije.....	26

KAZALO SLIK

Slika 1: shematski prikaz uporabe kalic pri poskusih rasti osočnika na slanem substratu.....	20
Slika 2: uvrstitev sekvenc, ki smo jih dobili z izolacijo DNA glivnih izolatov DB169 in DB170 = izolat DB171 v filogenetsko drevo.....	23
Slika 3: serija rasti glivnih izolatov iz korenin osočnika na PDA gojišču (●)in PDA gojišču z dodanim 5 % NaCl (○) in 50 % saharozo (▼).....	25
Slika 4: končna kalitev semen iz leta 2004 in 2007	27
Slika 5: dinamika kalitve malih in velikih semen, ki smo jih dali kalit različne mesece v sezoni 2007/08.....	28
Slika 6: končni odstotek kaljivosti velikih in malih semen.....	30
Slika 7: primerjava kalitve semen shranjenih na sobni temperaturi in v hladilniku.	31
Slika 8: rast kalic v posodah.....	32
Slika 9: rast kalic na tretmaju 0 % ->3 %.....	33
Slika 10: rast kalic na tretmaju 0 %->0,5 % -> 3 %.....	33
Slika 11: poskus meritev prirastkov kalic inokuliranih s sevi gliv DB169, DB170 in DB171 ter prirastki kalic na kontroli	35
Slika 12: povprečne mase korenin in poganjkov kalic navadnega osočnika vzgojenega na inokulatih gliv	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABA: abscizinska kislina

AM: arbuskularna mikoriza

ANOVA: analysis of variance

APG: Angiosperm Phylogeny Group

ARSO: Agencija Republike Slovenije za Okolje

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Cl: klor

DNA: (Deoxyribonucleic Acid) deoksiribonukleinska kislina (DNK)

DSE: (Dark Septate Endophytes) temno septirani endofiti

dNTP: deoksiribonukleotid

EDTA: etilen-diamin-tetraocetna kislina

H₂O₂: : vodikov peroksid

ITS: Internal Transcribed Spacer

K: kalij

KOH: kalijev hidroksid

L.: Carl Linnaeus

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MgCl₂: magnezijev klorid

MgSO₄: magnezijev sulfat

N: dušik

Na: natrij

NaCO₃: natrijev karbonat

NaSO₄: natrijev sulfat

P: fosfor

PCR: (Polymerase Chain Reaction) verižna reakcija s polimerazo

PDA: (Potato dextrose agar) agar krompirjeve dekstroze

rDNA: (Ribosomal DNA) ribosomska DNK

SN: standardna napaka

SV: srednja vrednost

SLOVARČEK

DIMORFIZEM SEMEN: pojav, ko ima ena rastlina dve obliki semen. Ta pojav je pomemben v spremenljivem okolju, kje imajo različna semena različne potrebe za kalitev.

DORMANCA: sposobnost semen, da kljub ugodnim okoljskim pogojem (temperatura, vlaga) ne kalijo, dokler se ne izpolnijo določeni pogoji za prekinitev dormance.

ENDOFITI: organizmi, ki kolonizirajo notranje organe rastlin.

GOJIŠČE: raztopina mineralov in ogljikovih hidratov, ki omogočajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov.

HALOFITI: rastline, ki uspešno rastejo v okolju z visokimi koncentracijami NaCl.

INOKULACIJA: vcepitev manjšega volumna z glivami bogatega gojišča h koreninam kalic.

MIKORIZA: simbioza glive s koreninami višjih rastlin. Poznani so trije tipi mikorize: endotrofna, ektotrofna in ekto-endotrofna.

TOLERANCA: sposobnost organizma, da raste in se razvija v sicer neugodnem okolju.

UVOD

1.1 Opredelitev problema

Slanost okolja je postala hud globalni problem, saj je eden izmed najpomembnejših abiotskih dejavnikov, ki omejuje rastlinsko rast in pridelek (Sheng in sod., 2009). V skrajnih primerih slane kmetijske površine ne omogočajo več rasti kmetijskih rastlin in jih je potrebno opustiti (Xiong in Zhu, 2002). Neposreden učinek slanosti na rastlinsko rast lahko vključuje tako zniževanje vodnega potenciala raztopine tal, kar zmanjša razpoložljivost vode za rastlino, kot tudi strupenost prekomernih koncentracij Na^+ ali Cl^- na plazmatsko membrano (Feng in sod., 2002).

Glede na sposobnost rasti v slanih okoljih delimo rastline na glikofite in halofite. Halofiti so rastline, ki lahko rastejo in se razvijajo uspešno ob prisotnosti visokih koncentracij soli (Khan in sod., 1985). Nekateri lahko vzdržijo slanosti raztopin, ki so večje od dvakratne koncentracije morske vode (Xiong in Zhu, 2002) in zato spadajo med rastline najprimernejše za ozelenitev okolja, kjer je visoka slanost velik problem.

Sečoveljske soline so antropogeno oblikovano okolje, kjer ljudje že več stoletij pridelujejo sol. Površina solin se deli na bazene za različne stopnje izhlapevanja in kristalizacijske bazene. Zaradi tega je na tem območju koncentracija soli večja kot v morju. Soline spadajo med okolja, kjer zaradi visoke slanosti lahko uspevajo le halofiti, med katere spada tudi navadni osočnik (*Salicornia europaea* L.). S privzemom soli iz tal navadni osočnik izboljša kakovost tal in je s tem pomemben člen bioremediacije. Poleg tega je rastlina tudi užitna (Chevalier 1922, cit. po Davy in sod., 2001) in s tem komercialno uporabna. Kljub temu, da je osočnik rastlina, ki je odlično prilagojena na razmere v solinah, pa obstajajo različni dejavniki, ki vplivajo na njeno rast. Poleg abiotskih dejavnikov na njegovo rast vplivajo tudi biotski dejavniki. Na koreninah navadnega osočnika in še nekaterih rastlin Sečoveljskih solin so ugotovili prisotnost mikoriznih gliv (Sonjak in sod., 2009). Znano je, da arbuskularno mikorizne glive izboljšajo rast rastlin in zmanjšajo izgube pridelka zaradi prekomerne slanosti (Sheng in sod., 2009). Za razlago pozitivnih učinkov mikoriznih gliv obstaja več hipotez. Lahko je to le posledica izboljšane vnosa hranil, lahko pa kakšen drugi vpliv tako na

rastlino kot na okolje. Razumevanje pomena slanosti in glivnih endofitov za uspevanje osočnika nam lahko pomaga pri izboljšanju vzgoje teh halofitov.

1.2 Namen in hipoteze

Namen naloge je bil pridobiti znanje za optimizacijo vzgoje komercialno pomembne slanuše navadnega osočnika. V diplomskem delu smo želeli raziskati in optimizirati vzgojo navadnega osočnika *Salicornia europaea*. Optimizirali smo kalitve pri različno velikih semenih tega halofita. Zanimal nas je tudi vpliv različnih koncentracij slanosti na rast in razvoj kalic osočnika. Pri navadnem osočniku je prisotna mikoriza z AM (arbuskularno mikoriznimi) in DS (temno septiranimi) glivami (Sonjak in sod., 2007), zato smo hoteli tudi ugotoviti, kako se rast osočnika v laboratoriju spremeni, če ga inokuliramo z avtohtonimi sevi gliv, ki smo jih predhodno izolirali iz korenin osočnika v naravi.

Pri tem smo postavili naslednje delovne hipoteze:

- Navadni osočnik ima dimorfna semena, katerih vloga v naravi je različna in ekološko pogojena. Velika centralna semena vzkaliijo spomladi in skrbijo za stalno populacijo osočnika, manjša lateralna semena imajo dormanco in se shranjujejo v semenski banki ter skrbijo za kalitev v ekstremnih razmerah. Pričakujemo, da je v pomladnih mesecih kalitev velikih semen večja kot jeseni, medtem ko sezona ne bi smela imeti velikega vpliva na kalitev malih semen. Mala semena pa bi za razliko od velikih morala ohraniti kalitev tudi v obdobju večih let.
- Navadni osočnik se v Sloveniji nahaja ob morju, v okolju, kjer so v obdobju pred kalitvijo razmeroma visoke temperature. S shranjevanjem semen na nizkih temperaturah bi jim sicer lahko povečali dolgoživost, vendar se lahko inducira dormanca in posledično zniža uspeh kalitve.
- Halofiti so dobro prilagojeni na visoke koncentracije soli. Le te imajo tudi pozitiven vpliv na njihovo rast. Pričakujemo, da bosta ob določeni koncentraciji soli rast in razvoj navadnega osočnika boljša kot v okolju brez povišane slanosti. Rastline, vzgojene ob prisotnosti soli, bi morale rasti bolje in biti večje od kontrolnih. Halofiti potrebujejo za uspešno rast ione soli. V okolju, kjer je koncentracija soli prenizka, je njihova rast

oslabljena, posledično pa so v takih ekosistemih manj kompetitivni, zato jih tam ne najdemo.

- Na slanih rastiščih se koncentracije soli v tleh v poletnih mesecih močno povečajo. Glivni endofiti osočnikov morajo ohraniti rast tudi v okolju s koncentracijami soli, ki so večje od tistih v morski vodi. Avtohtoni glivni endofiti, ki sodelujejo v asociaciji z navadnim osočnikom, bi morali uspešno rasti tudi na gojišču s povečano koncentracijo soli.
- Zaradi neugodnih razmer, ki vladajo na slanih rastiščih, nastajajo povezave med halofiti in glivami. Glive, ki tvorijo simbiozne asociacije s koreninami halofitov, izboljšajo njihovo rast in produktivnost. Take glive morajo biti dobro prilagojene na rast na slanem substratu. Ob inokulaciji z avtohtonimi glivnimi endofiti bi se morala rast naših kalic izboljšati.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Sečoveljske soline kot slano rastišče

Slana rastišča delimo na naravna in taka, ki nastanejo zaradi človekovega delovanja (antropogena). Po definiciji je rastišče slano, ko količina soli presega 1,5 % suhe mase tal (Trošt-Sedej, 2003). Značilnost vode v solinskih bazenih pa je višja vsebnost soli kot v morski vodi in spreminjanje koncentracije soli, od 3 do 35-odstotne skozi sezono pridobivanja soli (Koprivnikar, 2008). Primer slanah rastišč v Sloveniji so tudi Sečoveljske soline.

Sečoveljske soline ležijo v jugozahodnem delu Piranskega zaliva ob izlivu reke Dragonje v morje (Geister, 2004). Razprostirajo se na površini kakih 8 km². Na severu jih omejujejo flišne plasti Šavrinskega gričevja, na jugu pa apnenci Savudrijskega polotoka (Ogorelec in sod., 2000).

Tekom zgodovine so pripadale različnim državam od beneške republike preko francoskega in avstrijskega cesarstva do Italije, Jugoslavije in nazadnje Slovenije. Prvi viri o piranskih solinah segajo v 12. in 13. stoletje, obdobje, ko so si Benečani prizadevali dobiti monopol v trgovini z belim zlatom kot so takrat poimenovali sol (Ogorelec in sod., 2000). Sečoveljske soline so uspešno delovale več stoletij in doživele razcvet v 19. stoletju. V šestdesetih letih prejšnjega stoletja so popolnoma opustili pridobivanje soli v predelu Fontanigge in halofiti so pričeli preraščati solinska polja (Geister, 2004). Danes pridelujejo sol le na severnem delu Sečoveljskih solin, tako imenovanem polju Lera (Ogorelec in sod., 2000).

Slovenske Sečoveljske (Piranske) soline so leta 1989 postale krajinski park (Koprivnikar, 2008). Leta 1993 so bile zaradi izjemne ekološke vrednosti uvrščene na listo *Ramsarskih mokrišč Slovenije* (Pipan, 2008). Na tej listi, ki sodi pod okrilje organizacije UNESCO, so mednarodno pomembna mokrišča, ki predstavljajo pomembna prebivališča močvirskih ptic.

2.2 Halofiti

2.2.1 Splošno o halofitih

Rastline ločimo glede na njihov odgovor na slanost v dve skupini. Glikofiti ne morejo preživeti v okolju s prekomerno koncentracijo soli, saj nanje niso prilagojeni, kar se kaže v slabši rasti in propadu rastlin. Nekateri glikofiti lahko tolerirajo nizke koncentracije soli (nižje od 1 % vseh raztopljenih soli), vendar pri prekoračitvi kritične koncentracije raztopljenih soli kmalu pride do razbarvanja listov in izgube suhe mase. Glikofiti torej ne morejo uspevati v okolju kot so Sečoveljske soline, saj so tam koncentracije raztopljenih soli previsoke. Rastlinam, ki lahko rastejo v prisotnosti visokih koncentracij Na⁺ soli, pravimo halofiti (Flowers in Yeo, 1987, cit. po Moghaieb in sod., 2004). Te rastline vse življenje živijo v slanem okolju in so na to okolje dobro prilagojene. Rastejo tudi v okoljih, kjer je slanost nad 5 % mase na maso tal. Halofiti so odporni na slanost, ker lahko privzamejo vodo in obenem vzdržujejo visoki osmotski potencial preko kopičenja anorganskih ionov (Bradley in Morris, 1991, cit. po Moghaieb in sod., 2004). Z več kot 500 vrstami vsebuje družina Chenopodiaceae največje število halofitov med rastlinskimi družinami. Najdemo jih v večini glavnih vej v družini, vključno s poddružinami Betoideae in Chenopodioideae ter sukulentnih vej, ki vključujejo poddružine Salicornioideae, Suaedoideae, in Salsoloideae (Parka in sod., 2009). Po APG (Angiosperm Phylogeny Group) (1998) in APG II (2003) sistemu so to družino priključili družini Amaranthaceae. V poddružino Salicornide spada tudi navadni osočnik, rastlina, katere optimizacija vzgoje nas je zanimala v tej diplomii.

2.2.2 Navadni osočnik

Salicornia L. (Chenopodiaceae) je rod enoletnih, halofilnih zeli s členjenim sukulentnim stebлом, ki so navidezno brez listov (Davy in sod., 2001). Veje in steblo so sestavljeni iz kratkih, cilindričnih internodijev. Vsak od teh ima sukulentno, fotosintezno plast, ki daje členkast videz. Iz vsakega internodija izrašča po en par nasproti si ležečih, a zelo reduciranih listov. Zunanji deli starejših, predvsem bazalnih delov stebela, se kasneje izsušijo. Na njih ostane le rjavo nesukulentno tkivo.

2.2.2.1 Opis navadnega osočnika

Navadni osočnik je visok 35 cm in precej razvejan. Stranske nižje veje so lahko skoraj tako dolge kot glavno steblo. Tekom razvoja spreminja barvo iz temno zelene v rumeno-zelena in na koncu roza do rdeče. Vrh je dolg 10-60 mm (Davy in sod., 2001). Na koncu vseh

poganjkov se razvijejo klasasta socvetja z ugreznjenimi cvetovi. Srednji od treh cvetov vsakega kolenca leži razločno nad stranskima (Jogan in sod., 1999).

2.2.2.2 Razširjenost osočnika

Vrste osočnika najdemo v Severni Ameriki, Evropi, južni Afriki in južni Aziji. V Evropi je razširjen na večjem delu obale. Najdemo ga od Arktike do Sredozemlja, kot tudi na obalah Črnega in Kaspijskega morja. Poleg obalnih predelov je razširjen tudi na inozemskih slanih rastiščih po Evropi.

Osočnik se nahaja v različnih podnebnih tipih. Njegova razširjenost sega od subarktičnega do subtropskega in od oceanskega do celinskega podnebja. Kljub temu, da je prvi kolonist mehkih neutrjenih sedimentov, je njegova gostota največja na trdih muljih in glini (Adam, 1981, cit. po Davy in sod., 2001). Raste predvsem na slanih, brakičnih ali bazičnih substratih.

2.2.2.3 Združba in razporeditev osočnika

Osočnik lahko raste sam ali pa v združbi. Pri njem je znana združba *Salicornietum europaeae*. Poleg navadnega osočnika lahko v teh združbah najdemo še kak takson tega rodu. Naselitev osočnika je lahko različno gosta. Običajno se nahaja v odprtih kratkotrajnih združbah. Le te pogosto rastejo na sloju alg, ki prekrivajo substrat. Poleg vrst rodu *Salicornia* lahko tu najdemo še vrste *Puccinellia maritima*, *Suaeda maritima* in *Spartina angelica*. Občasno pa tudi vrsti *Atriplex portulacoides* in *Aster tripolium*. Take združbe lahko tvorijo samostojna območja široka od nekaj do več 100 metrov ali oblikujejo mozaike z drugimi vrstami. Semena osočnika se na široko razširjajo po slanih rastiščih in so pogosto del drugih združb, kjer tvorijo kratkotrajne sestoje na ozemlju trajnih vrst (Davy in sod., 2001).

Razporeditev osočnika je lahko naključna ali gručasta (Brereton, 1971, cit. po Davy in sod., 2001; Joenje, 1978, cit. po Davy in sod., 2001). V ugodnem okolju je gostota populacije sadik lahko večja od 100 000 na m² (Davy in sod., 2001). Največ semen lahko najdemo na mestu, kjer materinska rastlina propade in razpade v sediment. Ob razpadu se semena sprostijo. Tvorba semen je zelo odvisna od gostote populacije. Ploden nerazvejan poganjek osočnika tvori do 6 semen. Ob veliki gostoti so rastline nerazvejane in tvorijo malo plodnih vej. Tako imamo veliko rastlin s po šestimi semeni. Posamezne izolirane rastline pa so lahko velike in razvejane ter tvorijo veliko plodnih vej in do 1000 semen. S tem se razvije dovolj semen za uspešnost vrste, čeprav imamo le eno starševsko rastlino.

Osočnik ima pomembno vlogo kot pionirska vrsta v slanih mokriščih, saj je pogosto prva višja rastlina, ki kolonizira blato in pesek na območju bibavice in peščene plitvine (Davy in sod., 2001).

2.2.2.4 Življenjski cikel osočnika

Navadni osočnik kot terofit prezimi izključno v obliki semen v sedimentih solin. Semena odvrže pozno poleti, v Britaniji pa od septembra do poznega novembra. Njihova koncentracija se od poznega poletja do decembra močno poveča. Večina sproščenih semen se nahaja v zgornjih 5 mm sedimenta. Vzkalijo nekje do maja, lahko pa od februarja do junija, odvisno od okoljskih razmer. Za kalitev je značilno, da poteče v času padavin, ko je v substratu nižja koncentracija soli. Zaradi previsoke slanosti se lahko dormanca tudi podaljša. Semenom, ki po enem letu ne vzkalijo, se zmanjša viabilnost. V primerih, kjer imamo pri rastlinah opažen dimorfizem semen, le manjša semena ostanejo v semenski zasnovi dlje časa in ohranijo sposobnost kalitve. V obdobju vegetativne rasti se dodajajo novi segmenti stebela ter razen v zelo gostih populacijah tvorijo stranske veje (Davy in sod., 2001). Vegetativna rast traja do poznega julija ali avgusta, ko se na koncu vej tvorijo plodni segmenti. V zmernih razmerah, kakršne so pri nas, je rastna sezona od 7 do 8 mesecev. V ugodnih razmerah lahko rastlina zraste do 40 cm in se lahko razveja do četrte stopnje. Cvetenje traja od poznega julija do oktobra. Semena dozoriijo od septembra naprej in odpadejo iz starševske rastline. V Sredozemlju se osrednje seme dimorfne rastline vrste *S. europaea* (*S. patula*) prenaša pritrjeno na cvet, ki mu še poveča vzgon (Berger, 1985). Semena prezimijo in vzklijejo naslednjo pomlad.

2.3 Vplivi okolja na življenjski cikel rastlin na slanih rastiščih

2.3.1 Kalitev v slanem okolju

Za vzgojo navadnega osočnika je pomembno vedeti določene lastnosti kalitve v slanem okolju. Kalitev je bistvena stopnja rastlinskega življenja, zato je slanostna toleranca med kalitvijo odločilna za vzpostavitev rastlin, ki rastejo na slanih tleh (Bajji in sod., 2002). Za boljše razumevanje kalitve rastlin na slanih rastiščih moramo poznati dejavnike, ki v takem okolju vplivajo na kalitev.

Podobno kot pri glikofitih, imajo tudi semena halofitov optimalno kaljivost v sladki vodi, vendar se od njih razlikujejo po sposobnosti kalitve pri višjih slanostih (Ungar, 1995, cit. po

Zia in Khan, 2004). Rubio-Casal in sod. (2003) so dokazali dobro kaljivost vrste *Salicornia ramosissima* pri nizki slanosti. Povečana slanost (vse do 3 %) je povzročila le zakasnitev pri kalitvi, ne da bi pri tem znižala viabilnost semen (Rubio-Casal in sod., 2003).

2.3.1.1 Obdobje kalitve

Kljub temu da so halofiti sposobni kalitve v okolju z višjo koncentracijo soli, jim za kalitev najbolj ustreza obdobje, ko se v naravi koncentracija soli zniža. Carter in Ungar (2003) sta dokazala, da semena navadnega osočnika na mokriščih najbolje kalijo spomladi, ko je le to poplavljeno in je na predelih vseh združb slanost okoli 0,5 %. Poleti kalitev ni mogoča, saj je zaradi evaporacije v tleh prekomerna koncentracija soli, ki zavira rast kalic. Obstaja veliko dokazov, da osočnik najbolje kali v čisti vodi ali vsaj vodi z nižjo slanostjo. Za navadni osočnik je Ungar (1977) dokazal, da ima največjo kaljivost v destilirani vodi pri 25°C in najmanjšo v slanih raztopinah pri 10°C. Visoka slanost naj bi znižala optimalno temperaturo za kalitev (Langlois, 1966, cit. po Davy in sod., 2001). Učinek slanosti na kaljivost je le pogojna dormanca, saj semena, ki ne kalijo v visoki slanosti, po prenosu v destilirano vodo kalijo (Smith, 1985). S tem je dokazano, da slanost vpliva na kalitev z nižanjem vodnega potenciala in ne s strupenostjo soli.

2.3.1.2 Vpliv interakcije temperature in slanosti na kalitev

V okolju kot so Sečovljske soline je pomembno poznati tudi interakcijo vplivov slanosti in temperature na kaljivost semen. Tako sta na primer Zia in Kahn (2004) odkrila, da halofilna vrsta *Limonium stocksii* najbolje kali v popolni odsotnosti soli ne glede na temperaturo, medtem ko v slanem okolju najbolje kali pri temperturi od 20°C do 30°C in koncentraciji soli med 100 in 200 mmol/L. Povečana slanost inhibira tudi kaljivost osočnika pri vseh temperaturah (Khan in Weber, 1986), medtem ko višja temperatura izboljša njegovo kaljivost pri vseh koncentracijah soli. Ungar (1967) je dokazal, da imajo temperature do 32°C stimulacijski vpliv na kalitev osočnika.

2.3.1.3 Vpliv različnih soli na kalitev

Na slanih rastiščih ob morju so poleg NaCl prisotne tudi druge soli, ki različno vplivajo na kalitev. Zia in Kahn (2002) sta pri vrsti *Limonium stocksii* dokazala, da morska voda, ki je kombinacija različnih soli, bolj inhibira kaljivost kot raztopina NaCl, čeprav je NaCl najpogostejša sol v morski vodi. Pri poskusu Duana in sod. (2004) je bil NaCl slabši zaviralec kalitve kot NaCO₃, NaSO₄ in MgCl₂ in boljši kot vodni ekstrakt tal in MgSO₄.

2.3.1.4 Zaščita semen pred povečano koncentracijo soli

Z meritvami vsebnosti ionov v različnih delih osočnika so dokazali, da rastlina lahko nadzoruje količino Na^+ in Cl^- privzetega v semena, saj so njune koncentracije v semenih manjše kot v poganjkih. Z nadzorom nad količino Na^+ in Cl^- ionov, privzetih v semena, se halofiti izognejo poškodbam zaradi ionskega in osmotskega stresa v času razvoja zarodka (Khan in sod., 1985).

2.3.1.5 Vpliv shranjevanja in dormance

Kaljivost semen navadnega osočnika je zelo visoka in je v laboratoriju pogosto med 90 in 100 %. Visoka ostane tudi, če semena suho shranjujemo dlje časa na sobni temperaturi. Semena, ki odpadejo zgodaj v jeseni, so dormantna. Prekinitev dormance semen s hladno stratifikacijo je bila pogosto opisana pri populacijah osočnika (Langlois, 1966, cit. po Davy in sod., 2001; Grouzis, 1973, cit. po Davy in sod., 2001; Ungar, 1977). Dormanca se prekine po petih tednih izpostavljenosti nizkim temperaturam. V času trajanja obdobja z nizkimi temperaturami je kalitev inhibirana (Huiskes in sod., 1985), tako da se ustvari pogojna dormanca. Le ta nastane preko zime, ko nizke temperature onemogočijo procese v celicah, ki so potrebni za kalitev. Ob ustreznih pogojih se ta dormanca lahko prekine in semena kalijo. V primeru, da se semena sprostijo pozno jeseni, pa za prekinitev dormance potrebujejo krajše obdobje nizkih temperatur (Davy in sod., 2001). Prekinitev dormance s hladno stratifikacijo je verjetno strategija osočnika v hladnejših klimatih. V Sečoveljskih solinah, kjer so temperature preko celega leta višje, bi lahko nizke temperature inducirale dormanco. Tudi sušenje svežih semen na zraku in tretiranje z visoko slanostjo (enakovredno morski vodi) lahko prekineta dormanco (Smith, 1985). Semena kalijo najbolje pri visokih temperaturah, tudi nad 30°C.

2.3.1.6 Pomen dimorfnih semen za kalitev osočnika

Semena navadnega osočnika so dimorfna. Carter in Ungar (2003) sta ločila semena na večja (>1.5 mm po dolžini), ki se tvorijo v osrednjem cvetu in manjša semena (<1.4 mm po dolžini), ki se tvorijo v stranskih cvetovih. Pogoji za kalitev in vzorci med heteromorfnimi semenimi posamezne vrste se pogosto razlikujejo (Carter in Ungar, 2003). Majhna semena naj bi imela primarno dormanco in bila pozitivno fotoblastična. Ta semena tvorijo trajno semensko banko, saj po sezoni vstopijo ponovno v cikel dormance. Tvorba trajne semenske banke zagotovi preživetje teh populacij tako, da jim omogoča okrevanje po katastrofičnih dogodkih (Carter in Ungar, 2003). Velika semena osočnika spomladi prekinejo dormanco in v celoti vzkalijo tekom rastne sezone.

2.3.2 Rast rastlin v slanem okolju

Po uspešni kalitvi morajo rastline Sečoveljskih solin kljubovati visokim koncentracijam soli tudi v času rasti in razvoja. Rastline, ki rastejo v slanih habitatih (halofiti), se tekom ontogeneze prilagodijo na visoko vsebnost soli v tleh (Ushakova, 2005).

2.3.2.1 Prilagoditve rastlin na slanih rastiščih

Ena izmed značilnosti halofitov je sukulentnost, ki je povezana s povečanjem celic, zmanjšanjem površine glede na volumen tkiva in visoko vsebnostjo vode na enoto površine (Waisel, 1972, cit. po Parka in sod., 2009). To daje rastlini zaščito pred sušo in slanostjo, saj ima zalogo vode za nemoten potek fotosinteze in obenem prostor za shranjevanje odvečne soli.

Zmanjšanje listne površine, povečana koreninska rast, zaprtje listnih rež in abscizija listov so še nekatere izmed prilagoditev halofitov na specifičnost njihovega rastišča.

Manjša listna površina v okolju, kjer vode primanjkuje zmanjša transpiracijo. S tem je tudi izguba vode manjša. Krajši listi potrebujejo tudi manj hranil za rast. Odvečna hranila se tako lahko nalagajo v korenine, kjer omogočajo rast korenin, s čimer slednje sežejo do globljih še vlažnih predelov tal.

Odebelitev kutikule in nalaganje voska na kutikulo sta učinkoviti prilagoditvi za zmanjšanje transpiracije. Visoke temperature povzročajo segrevanje listov. S spremembo velikosti listov in njihove orientacije se rastlina ohlaja. Manjši listi z manjšo mejno zaščitno plastjo olajšajo sproščanje toplote v zrak. Temperatura teh listov ostaja podobna temperaturi okolja. Z orientacijo stran od sonca se listi izognejo pregrevanju. Pri ohlajanju listov lahko pomagajo dlačice ali vosek na listih (Trošt-Sedej, 2003).

Osmotski stres vpliva na ekspresijo genov povezanih z membranskim transportom, proteazami, »heat shock« proteini, širjenjem celic in zaščito celične membrane. Poznamo dve vrsti genov, ki se aktivirajo zaradi osmotskega stresa; i) ABA-odvisni geni, za katere je značilen vpliv abscizinske kisline in ii) ABA neodvisni geni, ki niso pod vplivom abscizinske kisline. Vodni stres vpliva tudi na aktivacijo genov za sintezo kompatibilnih topljencev v celici (Taiz in Zeiger, 2002).

2.3.2.2 Osmotsko uravnavanje v celici ter pomen ionov pri halofitih

Za vodno ravnotežje v rastlini je zelo pomembno osmotsko uravnavanje v celici. To je prilagoditveni mehanizem, ki pri rastlinah lahko pomaga pri toleranci na sušo in je posledica neto akumulacije topljencev v celicah kot odgovor na znižanje vodnega potenciala v okolju (Chimenti in sod., 2002, cit. po Silveira in sod., 2009; Wang in sod., 2003, cit. po Silveira in sod., 2009). Ta mehanizem se uporablja za vzdrževanje turgorja in zmanjšanje škodljivih učinkov vodnega stresa na vegetativno in razmnoževalno tkivo (Flowers in sod., 1991, cit. po Moghaieb in sod., 2004).

Rastline lahko črpajo vodo le dokler je njihov vodni potencial nižji od potenciala vode v tleh. Da ne bi prišlo do poškodb v celici, rastlina uravnava osmozo v celici tako, da ne zmanjša niti turgorja niti volumna celice. Z ohranjanjem turgorja sta omogočena tudi podaljševanje celic in transpiracija. To omogoča rastlini, da normalno deluje tudi v stresnih razmerah. Osmotsko uravnavanje ima velik pomen v koreninah. V meristemu uravnavanje omogoča korenini rast, da doseže globine, kjer se še nahaja voda (Taiz in Zeiger, 2002).

Mehanizem osmotskega uravnavanja je še posebej pomemben pri halofitih, kjer je vode dovolj, a je le težko dostopna zaradi soli. Mnogo halofitov vzdržuje osmotski gradient za privzem vode iz sedimentov tako, da kopiči anorganske ione v koncentracijah, ki so enake ali večje od koncentracij ionov v talni raztopini (Bradley in Morris, 1991, cit. po Moghaieb in sod., 2004). Navadno poteka tako, da se poveča koncentracija sladkorjev, organskih kislin, aminokislin in neorganskih ionov (K^+). Vendar lahko pri prekomernem privzemanju soli v citoplazmo, pride do učinkov strupenosti, saj lahko ioni inhibirajo različne encime (Parka in sod., 2009). Zato določeni halofiti lahko zaščitijo celice pred škodljivimi učinki soli tako, da izolirajo ione soli v vakuole specializiranih celic, trihomov, ki se nahajajo na listnem epidermisu (Glenn in sod., 1999, cit. po Silveira in sod., 2009). Halofiti uporabijo odvečne koncentracije ionov v svojo korist, saj so le ti energetsko bolj ugodni od organskih spojin za vzdrževanje nizkega vodnega potenciala v celicah. Ker je NaCl-a največ, se ustvarijo transportni mehanizmi za kopičenje Na^+ v vakuoli (Xiong in Zhu, 2002). Ioni soli (Na^+ , Cl^-) in manjši del K^+ so tako ponavadi ločeni v vakuole, medtem ko se večina K^+ in praktično vse organske osmotske raztopine nahajajo v citosolu (Flowers in sod., 1977, cit. po Silveira in sod., 2009).

Kopičenje ionov v vakuoli povzroča, da se v citoplazmi kopičijo kompatibilni topljenci, s čimer se ohranja ravnovesje vodnih potencialov v celici. Kompatibilni topljenci so organske spojine, ki nimajo vpliva na delovanje encimov. Sem sodijo prolin, glicin betain, sorbitol, manitol, pinitol in saharoza. Ponavadi v posamezni rastlinski vrsti prevladujeta ena ali dve kompatibilna topljenca. Glicinbetain je tako praktično odsoten v nekaterih poljskih vrstah kot so riž in paradižnik, medtem ko ga v velikih količinah najdemo pri predstavnikih družine Chenopodiaceae (Jones in Storey, 1981, cit. po Silveira in sod., 2009; McCue in Hanson, 1990, cit. po Silveira in sod., 2009). Dokazano je, da glicinbetain ščiti fotosistema I in II ter Rubisco pred slanostnim stresom. Poleg tega z drugimi kompatibilnimi topljenci ščiti C₄ encim piruvat, Pi dikinazo pred hladno inaktivacijo (Parka in sod., 2009). S sintezo kompatibilnih topljencev se rastlina prilagodi tudi na povečano slanost v okolici korenin.

Osmotsko uravnavanje je mehanizem, ki ga uporablja tudi navadni osočnik. Moghaieb in sodelavci (2004) so s poskusom pokazali, da je glavna strategija za ohranitev rasti vrst *S. europaea* in *S. maritima* v okolju z visoko koncentracijo Na⁺, privzem in transport Na⁺ v vakuole ter hkratna sinteza kompatibilnih topljencev (prolin and betain) za vzdrževanje osmotskega ravnovesja.

2.3.2.3 Strupenost ionov in njihovo izločanje

Poleg nizkega vodnega potenciala je velik problem tudi strupenost ionov, ki nastane zaradi prekomernih koncentracij soli v okolju. V rastlinah, ki rastejo v takem okolju, pride do nenormalno visokega razmerja med Na⁺ in K⁺ ter povečanja koncentracij vseh soli, ki inaktivirajo encime in inhibirajo sintezo proteinov (Xiong in Zhu, 2002).

Velike koncentracije Na⁺, vplivajo na prepustnost membrane. Poleg tega prekomerna koncentracija Na⁺ in Cl⁻ ionov inhibira fotosintezo. Ti ioni so škodljivi tudi za encime fotosinteze pri halofitih, vendar so le ti razvili določene zaščitne mehanizme. Poškodbe slanosti zmanjšajo tako, da izločijo sol iz meristemov. Sol se izloča predvsem v poganjkih in iz listov, ki se aktivno razširjajo in fotosintetizirajo. Že v koreninah je kasparijev trak, ki prepreči ionom prehajanje v ksilem. Cl⁻ ioni se iz korenin izločajo pasivno, obenem pa je prepustnost membrane v koreninah za te ione nizka. Tako so le-ti manjši problem kot Na⁺, za katere je prepustnost boljša. Za izločanje Na⁺ je potrebna energija, saj le ta vstopa v korenine pasivno z električnim potencialnim gradientom. Na⁺ se zato izloči iz ksilema še tekom

transporta proti listu. Nekatere rastline lahko tvorijo solne žleze za izločanje odvečne soli (Trošt-Sedej, 2003).

2.3.3 Glivni endofiti in njihov vpliv v slanem okolju

2.3.3.1 Splošno o endofitih

Endofiti kolonizirajo organe gostitelja pogosto brez bolezenskih znakov. Kljub temu pa lahko po določeni inkubacijski ali latentni dobi povzročijo tudi njegovo bolezen (Petrini, 1991, cit. po Sikora in sod., 2008). Glivni endofiti pogosto sodelujejo pri zaščiti rastline pred patogeni in rastlinojedi ter izboljšanju preskrbe rastlin z vodo in minerali (Smith in Read, 2008). Najpogostejši glivni endofiti so mikorizne glive, ki z rastlinami tvorijo simbiozo. Precej slabše pa je raziskana skupina gliv označenih kot temni septirani endofiti, ki z rastlinami tvorijo precej širši spekter interakcij (od šibkega parazitizma, komenzalizma do simbioz). V mikorizi rastlina od glive prejme vodo in mineralna hranila, rastlina pa v zameno glivo oskrbuje s sladkorji (Smith in Read, 2008).

Mnogo je dokazov, da arbuskularna mikoriza koristi rasti rastlin predvsem zaradi razvoja zelo široke mreže hif v tleh ter s tem bolj učinkovitega izkoriščanja nutrientov (Beauregard in sod., 2008). Mikorizne glive pa ne pripomorejo samo k izboljšani prehrani rastlin, temveč tudi k strukturi tal (Rosemeyer in sod., 2000).

2.3.3.2 Mikoriza v slanem okolju

Interakcije rastlin z glivnimi endofiti so še posebej pomembne na ekstremnih rastiščih kot so soline. V tem okolju, kjer je prisoten močan vodni stres, gliva sodeluje pri zaščiti pred le tem s preskrbo rastline z vodo (Selosse in sod., 2004). Poleg tega so mikorizne glive pomembne tudi pri ublažitvi posledic ionskega stresa (Garg in Manchanda, 2009; Wu in sod., 2009).

Številni viri opisujejo, da lahko glive arbuskularne mikorize izboljšajo slanostno odpornost mnogih rastlin, ter da potečejo določene fiziološke spremembe v AM simbiozi pod vplivom slanosti (ZhongQun in sod., 2007). Primera fiziološke zaščite sta osmotska sprememba v koreninah in nižanje vodnega potenciala (Selosse in sod., 2004).

Za preživetje v slanih razmerah je pomembna tudi učinkovita oskrba z nutrienti. Izboljšanje rasti mikoriznih rastlin je lahko posledica izboljšane oskrbe gostitelja s P. Pri poskusu z vrsto *Parthenium argentatum* (Pfeiffer in Bloss, 1987) je bila rast spodbujena v enaki meri z dodatkom P kot z inokulumom AM glive *G. intraradices*.

Korist mikorize se lahko izraža na gostitelju, s povečano rastjo in sposobnostjo privzema N, P in K (Porras-Soriano in sod., 2009) ali s povečano koncentracijo klorofila ter vsebnosti sladkorjev mikoriznih rastlin (Rabie, 2005). Pozitivne lastnosti so se izražale tako pri mikorizi oljke (*Olea europaea*) (Porras-Soriano in sod., 2009) kot pri zelenem mungo fižolu (*Vigna radiata*) (Rabie, 2005) ne glede na to ali so jih vzgajali v sladki ali v slani vodi. S tem so dokazali, da ima mikoriza pomemben učinek na rast rastlin tudi v okolju z vplivom morske vode, kjer bi lahko visoka slanost zavirala rast mikoriznih gliv in s tem preprečila njen pozitiven vpliv.

2.3.3.3 Mikoriza pri osočniku

Mikorizo sta pri vrsti *S. europaea* prvič opazila Klecka in Vokulov (1937) na Češkoslovaškem (Davy in sod., 2001). Kolonizacija osočnika z glivami je zelo različna ter odvisna od lokacije. Na Nizozemskem so Rozema in sod. (1986) odkrili med 0,1-1 % kolonizacijo korenin z AM mikorizo. Hildebrandt in sod (2001) pa so opazili, da ima vrsta *S. europaea* na dveh slanih mokriščih v notranjosti Nemčije obsežno koreninsko kolonizacijo z arbuskuli in vezikli, medtem ko je bila kolonizacija na Baltski obali le 3 %. Spore, prisotne v visokih koncentracijah v tleh na nahajališčih v notranjosti, so bile v glavnem določene kot vrsta *Glomus geosporum* (Davy in sod., 2001). V Sečoveljskih solinah so odkrili prisotnost DSE gliv na koreninah navadnega osočnika, ki so jih identificirali kot *Capnobotryella sp.* / *Phaeotheca fi ssurella*. Poleg zgoraj omenjenih DSE gliv so identificirali še glivo *Cylindrobasidium laeve*, ter AM glivo *Glomus mosseae*. Identificirali so tudi predstavnike družine *Trichocomaceae* (*Penicillium*, *Aspergillus* ...), ter vrsti *Coniosporium sp.* / *Glyphium elatum* (Glavina s sod, 2005; Sonjak in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 Materiali

3.1.1 Rastlinski in glivni material

Za poskuse kalitve smo uporabili semena navadnega osočnika (*Salicornia europaea* L.), ki smo jih nabrali v Sečoveljskih solinah. Za poskuse rasti kalic osočnika in inokulacijske poskuse smo uporabili kalice osočnika, ki smo jih vzgojili v laboratoriju.

Glivne izolate, ki smo jih uporabljali v poskusih, smo izolirali iz korenin osočnikov nabranih v Sečoveljskih solinah.

3.1.2 Sestava raztopin

3.1.2.1 Hoaglandova raztopina

Za 1L raztopine smo dodali:

- 1M KNO₃ Kalijev nitrat 0.505 g
- 1M Ca(NO₃)₂ Kalcijev nitrat 1.1807 g
- 1M KH₂PO₄ Kalijev hidrofosfat 0.136 g
- 1M MgSO₄ Magnezijev sulfat 0.49 g
- 1 mL mikronutrienti
- 0.01M Fe-EDDHA namesto tega sem uporabil Fe, Na EDTA 0.037 g

Mikronutrienti: na L

- 0.046M H₃BO₃ Borova kislina 2.86 g
- 0.009M MnCl₂x4H₂O Manganov klorid 1.81 g
- 7.65x10⁻⁴ ZnSO₄x7H₂O Cinkov sulfat 0.22 g
- 3.2x10⁻⁴ CuSO₄x5H₂O Bakrov sulfat 0.08 g
- 1.11 x10⁻⁴ Na₂MoO₄xH₂O Molibdična kislina mi smo uporabili Natrijev molibdat (Na₂MoO₄) 0.02 g

3.1.2.2 Sestava barvila Tripan modro

barvilo tripan modro	masa (g)
• destilirana voda	40g
• mlečna kislina	40g
• glicerol	80g
• tripan modro	0,08g

3.2 Metode dela

3.2.1 Izolacija, identifikacija in toleranca glivnih endofitov osočnika

Za ugotavljanje vpliva glivnih izolatov, najdenih na avtohtonih rastlinah navadnega osočnika na njegovo rast, smo jih hoteli inokulirati našim v laboratoriju vzgojenim osočnikom. Izolate smo tako najprej identificirali ter jim preverili odpornost na slanost.

3.2.1.1 Izolacija glivnih endofitov

Korenine, iz katerih smo izolirali glivne endofite, smo vzorčili septembra 2007 na področju solin imenovanem Fontanigge. Del nabranih korenin smo ločili na 4 ektomikorizne morfotipe in sicer tako, da smo korenine osočnika narezali na 1 cm dolge fragmente in jih površinsko sterilizirali v 70 % etanolu 15 sekund, nato pa v natrijevem hipokloritu z 1,5 % aktivnega klora 2 minuti. Sterilizirane koreninske vršičke smo 3x po 15 min spirali s sterilno destilirano vodo in jih nato prestavili na gojišče PDA (Difco) z dodanim kloramfenikolom. Na eno petrijevko z gojiščem smo postavili 5 koreninskih vršičkov; skupaj 10 koreninskih vršičkov vsakega morfotipa s posamezne rastline.

Rast je potekala v temni komori pri temperaturi 23°C in 80 % zračni vlažnosti. Na dva dni smo spremljali rast gliv in morebitne okužbe na gojišču. Ko je micelij zrasel do premera 2 cm, smo z robov precepili glivo na novo gojišče. Po 1-2 tedenski rasti smo izolat shranili pri 8°C.

3.2.1.2 Identifikacija glivnih endofitov

3.2.1.2.1 Izolacija in pomnožitev glivne DNA

Za molekularno identifikacijo glivnih izolatov smo izolirali glivno DNA upoštevajoč navodila iz protokola GenElute Plant Genomic DNA (Sigma). Izolirano glivno DNA smo pomnožili s tehniko verižne reakcije s polimerazo (PCR). Pri tem smo uporabili začetne oligonukleotide ITS-1F in ITS4 (Gardes in Bruns, 1993; White in sod., 1990).

PCR mešanica:

- 2.5 μ L 10X PCR pufra
- 2.5 μ M $MgCl_2$
- 200 μ M posameznega nukleotida (dNTP)
- 500 μ M posameznega primerja (ITS-1F, ITS-4)
- 0,75 U Taq polimeraze (Promega)
- 12.5 μ L 100X redčenega DNA eksterkta

Pomnoževanje DNA je potekalo v napravi za PCR po modificiranem protokolu opisanem v Gardes in Bruns (1996):

Tabela 1: Potek PCR postopka

	T (°C)	t (min)	ponovitve cikla
začetna denaturacija	95	2	1
denaturacija	95	1	30
vezava začetnih oligonukleotidov	62	1	30
elongacija	72	1	30
končna elongacija	72	10	1
ohranjanje produkta	4	∞	

3.2.1.2.2 Sekvenciranje in filogenetske analize

Sekvenčno analizo produktov PCR so izvedli po našem naročilu v podjetju Macrogen (www.macrogen.com/eng/macrogen) (Južna Koreja). Analiza je bila izvedena na sekvenatorju 3730xl DNA analyzer« (Applied Biosystems, ZDA) z enakima začetnikoma, kot smo jih uporabili pri pomnoževanju. Za primerjavo zaporedij smo uporabili program BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) in bazo podatkov GenBank. Za poravnavo nukleotidnih zaporedij in analizo podobnosti smo uporabili program MEGA 4 (Kumar in sod., 2008). Analizo podobnosti smo izvedli s 1000 ponovitvami.

3.2.1.3 Toleranca glivnih izolatov na slanost

Za teste tolerance glivnih izolatov na povečano slanost oz. nizek vodni potencial smo glive nacepili na PDA gojišče z dodanimi 5 % NaCl, 17 % NaCl ali 50 % saharoze. Za kontrolo smo uporabili PDA gojišče brez dodanega NaCl ali saharoze. Glive smo nacepili s plutovrtom, s čimer smo zagotovili uniformno velikost nacepljenih delov micelija. Rast gliv smo spremljali v 2 do 5 dnevnih časovnih razmikih tako, da smo s programom ImageJ ([Rasband, http://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)) izmerili površino micelija. Poskus smo ponovili 2-krat, z 10 paralelkami/glivo/tretma.

3.2.2 Kalitev in rast kalic

3.2.2.1 Nabiranje semen osočnika

Vzorci rastlin *Salicornia europaea* smo nabrali konec septembra 2007 in 2008 v Sečoveljskih solinah. Vzorčno mesto obsega okoli 50 m² in se nahaja na starem delu solin, v predelu, ki se imenuje Fontanigge. Ker je ta del solin že več desetletij opušččen, raste tu naravna vegetacija nemoteno. Rastline, ki smo jih nabrali, so rasle tik ob robu bazenov za pridelavo soli. Rastline iz leta 2007 so bile suhe že v času, ko smo jih nabrali. Tiste iz leta 2008 pa smo morali najprej približno en mesec sušiti. S pinceto smo semena previdno odstranili od suhih rastlin in jih do uporabe shranili v hladilnik na 4°C.

3.2.2.2 Površinska sterilizacija semen

Pred poskusi kalitve smo preizkusili različne metode površinske sterilizacije:

- Kalitev brez sterilizacije: semena niso bila predhodno sterilizirana
- Sterilizacija z natrijevim hipokloritom: semena smo za eno minuto potopili v 0,52 % natrijev hipoklorit, nato smo semena 2-3-krat sprali s sterilno destilirano vodo.

- Sterilizacija z vodikovim peroksidom: semena smo sterilizirali s 5 minutnim namakanjem v 10 % H₂O₂, ter spiranjem z destilirano vodo. Zaradi najboljših rezultatov s to metodo sterilizacije, smo jo uporabili pri vseh nadaljnjih poskusih.

3.2.2.3 Kalitev

Semena smo kalili v petrijevkah premera 9 cm z dvema slojema filtrirnega papirja, ki smo ga namočili z destilirano vodo. Semena smo kalili v rastnih komorah pri 16/8 h dnevno/nočni ritmiki in pri 22-25°C. Na vsaka dva do tri dni smo preverili kaljivost in namočili filtrirni papir. Semena smo označili kot vzklita, ko smo opazili razvit poganjek in koreninico. Poskus smo zaključili po 35 dneh.

3.2.2.3.1 Vpliv dolžine shranjevanja na kalitev semen

Vpliv dolžine shranjevanja smo preverili tako, da smo hkrati kalili semena, ki so bila shranjena od leta 2004 ter semena nabrana septembra 2007, mesec dni pred poskusom.

3.2.2.3.2 Vpliv velikosti semen na kalitev

Za testiranje vpliva velikosti semen na kalitev osočnika smo ločeno kalili velika in majhna nestratificirana semena nabrana konec septembra 2007. Poskus smo ponovili različne mesece v sezoni 2007 in 2008.

3.2.2.3.3 Sezonska dinamika kalitve

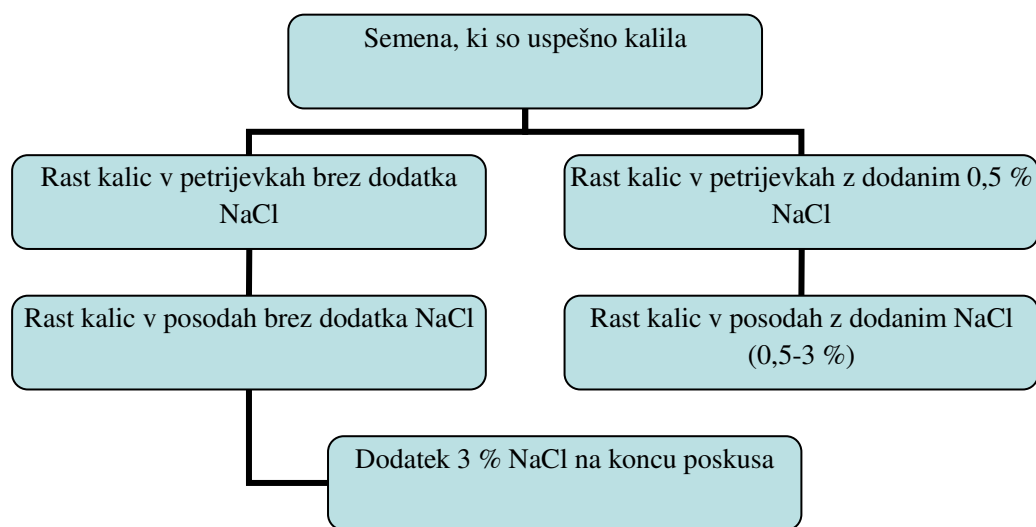
Pri tem poskusu smo primerjali končne odstotke kalitve semen nabranih konec septembra 2007 in kalitih različne mesece v rastni sezoni. Nabrana semena smo kalili v različnih mesecih (okt-jun), s čimer smo preverjali sezonsko odvisnost kalitve v različnih obdobjih po sproščanju iz rastline.

3.2.2.3.4 Vpliv temperature shranjevanja na kalitev semen

Naredili smo tudi poskus vpliva nizkih temperatur na kaljivost in sicer tako, da smo hkrati kalili semena predhodno shranjena na sobni temperaturi in semena, ki smo jih 60 dni skladiščili v hladilniku.

3.2.2.4 Vpliv slanosti na rast kalic

Vpliv slanosti na rast kalic smo preverili v petrijevkah z vermikulitom kot substratom. Rastline smo zalivali z $\frac{1}{4}x$ Hoaglandovo raztopino z dodanim 0,5 % NaCl. Kontrolne petrijevke smo zalivali samo z $\frac{1}{4}x$ Hoaglandovo raztopino. Rast kalic smo spremljali 40 dni tako, da smo enkrat na teden izmerili njihovo višino. V nadaljevanju smo kalice iz petrijevk presadili v posode in tam spremljali rast še 90 dni, pri čemer smo slanost ob rasti v posodah povečali na 3 % NaCl.



Slika 1: Shematski prikaz uporabe kalic, ki so kalila iz semen nabranih septembra 2007 pri poskusih rasti osočnika na slanem substratu.

3.2.3 Inokulacija osočnika z glivnimi endofiti

3.2.3.1 Inokulacija osočnika

Rastline osočnika stare 100 dni smo inokulirali s tremi glivnimi izolati, ki smo jih izolirali iz korenin osočnika in so shranjene v glivni banki Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin (DB169-DB171).

Za inokulacijo smo glivne izolate, nacepili na steriliziran substrat (vermikulita : humko = 50 : 50, V/V), zalit s krompirjevo dekstrozo (PD, Difco). Glive so pred inokulacijo 90 dni rasle v temni komori na temperaturi 20°C. Inokulacijo smo izvedli z dodatkom plasti z glivo preraščenega substrata v plastični lonček, v katerega smo posadili kalice osočnika. Med rastjo smo rastline zalivali z $\frac{1}{4}x$ Hoaglandovo raztopino s 3 % NaCl. Rast smo spremljali, tako da

smo zmerili velikost rastlin od površine substrata do vrha terminalnega poganjka. Po 70ih dneh smo rastline previdno vzeli iz zemlje in stehali korenine ter poganjke. Na koreninah rastlin smo ocenili tudi glivno kolonizacijo.

3.2.3.2 Barvanje korenin za pregled znakov glivne infekcije

Sveže korenine kalic osočnika smo sprali pod tekočo vodo in razbarvali z 10 % raztopino KOH. Razbarvane korenine smo pobarvali z 0,05 % Tripan modrim po protokolu opisanemu v Phillips in Hayman (1970). Glivno kolonizacijo smo ovrednotili na 1-cm fragmentih (15 fragmentov/rastlino) po metodi opisani v Trouvelot in sod. (1986).

Na enak način smo pobarvali tudi poganjke, s čimer smo želeli preveriti prisotnost uporabljenih glivnih endofitov v poganjkih.

3.3 Statistična obdelava podatkov

Za obdelavo podatkov smo uporabili analizo variance (ANOVA) in t-test pri $p < 0,05$. Vse statistične obdelave smo naredili v programu SigmaStat (SigmaStat Software, Ltd.).

4 REZULTATI

4.1 Endofiti

4.1.1 Uspešnost izolacije

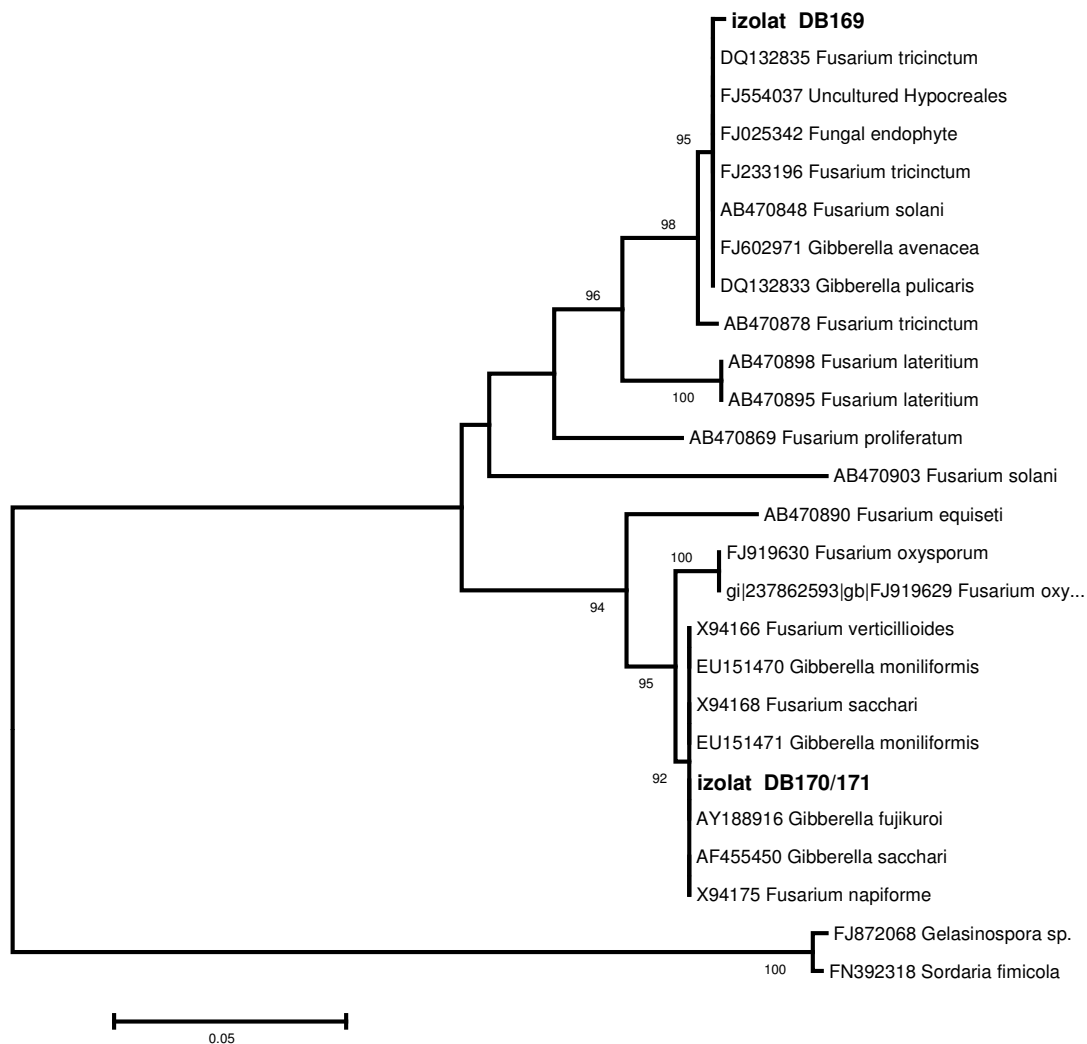
Izolate gliv, ki smo jih uporabili, smo vzorčili iz koreninskega sistema dveh rastlin navadnega osočnika septembra 2007 na območju Fontanigge, vendar ne sočasno s semeni za poskus kalitve. Za poskuse smo uporabili 16 korenin teh dveh rastlin, ki smo jih razdelili na odseke glede na njihovo lokacijo vzdolž korenine. Odseke smo poimenovali s črkami A, B, C, in Č in sicer odsek A je bil najbližje stebelu, le temu sta sledila odseka B in C, Č pa je bil najgloblje v zemlji. Na eno petrijevko z gojiščem smo postavili 5 koreninskih vršičkov; skupaj 10 koreninskih vršičkov vsakega morfortipa s posamezne rastline. Izolacija iz območja B ni uspela. Izolate iz območij A, C in Č smo poimenovali kot DB169, DB170 in DB171.

4.1.2 Identifikacija in določitev DNA sekvenc:

Za identifikacijo sevov gliv, ki smo jih izolirali iz koreninskega sistema navadnega osočnika, smo morali najprej izolirati ter namnožiti glivno DNA. Po namnožitvi in sekvenciranju smo dobljene sekvence uvrstili v filogenetsko drevo (slika 2).

Uvrstitev sekvenc v filogenetsko drevo nam je pokazalo, da sta tako izolat DB169, kot izolat DB170 genetsko najbolj sorodna glivam iz rodu *Fusarium*. Sekvenci izolatov DB170 in DB171 sta bili identični.

Filogenetsko drevo izolatov uporabljenih v tej diplomi:

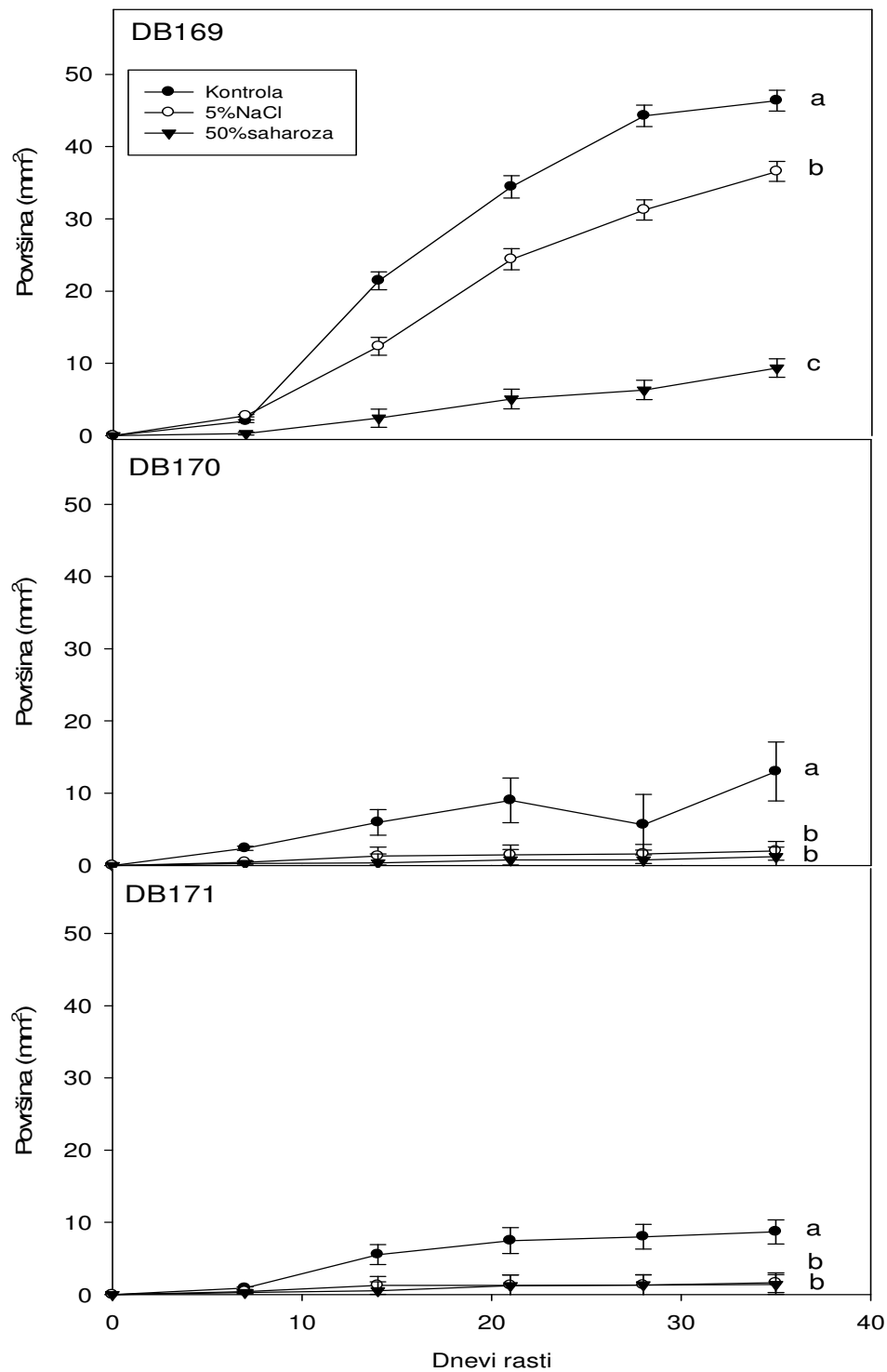


Slika 2: Uvrstitev sekvenc, ki smo jih dobili z izolacijo DNA glivnih izolatov DB169 in DB170 = izolat DB171 v filogenetsko drevo. Kot zunanjika smo uporabili glivi *Gelasinospora* sp. in *Sordaria fimicola*. Številke ob razvejitvah predstavljajo vrednosti metode vezanja (bootstrap), ki presežajo 65 %. Na dnu filogenetskega drevesa je merilo, ki predstavlja število nukleotidnih zamenjav.

4.1.3 Toleranca izolatov na slanost

Pri tem poskusu smo hoteli ugotoviti toleranco glivnih izolatov, izoliranih iz korenin avtohtonih rastlin osočnika na povečano koncentracijo NaCl. Zato smo jih nacepili na gojišče krompirjeve dekstroze z dodanim 5 % in 17 % NaCl. Da bi ugotovili le vpliv znižanega vodnega potenciala brez vpliva Na⁺ in Cl⁻ ionov, smo naredili poskus še z 50 % koncentracijo saharoze.

Poskus smo dvakrat ponovili. Obakrat je najboljšo rast prikazal izolat DB169 (slika 3). Ob izpostavljenosti 5 % NaCl je površina rasti bila manjša, vendar še vedno precej visoka. Saharoza je na izolat slabše vplivala kot NaCl, saj je v tem tretmaju bila rast precej slabša. Izolata DB170 in DB171 sta pokazala večji negativni vpliv slanosti. Že v kontroli je bila rast občutno manjša od rasti izolata DB169. V tretmajih s sladkorji in NaCl pa izolata DB170 in DB171 nista skoraj nič zrasla. Med tema tretmajema ni bilo opazne nobene statistično značilne razlike. Naredili smo še poskus s 17 % raztopino NaCl kjer pa ni bilo opazne nobene rasti. Rezultati poskusa tolerance se ujemajo z ugotovitvami identifikacije izolatov.



Slika 3: Prva serija rasti glivnih izolatov iz korenin osočnika na PDA gojišču (●)in PDA gojišču z dodanim 5 % NaCl (○) in 50 % saharozo (▼) (SV ± SN, n = 10). Enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post hoc test. Različne črke označujejo statistično značilno razliko pri p < 0,05.

4.2 Kalitev

4.2.1 Načini sterilizacije semen pred kalitvijo

Pred poskusi kalitve smo opravili še test različnih načinov površinske sterilizacije semen, s čimer bi preprečili plesnenje med poskusom.

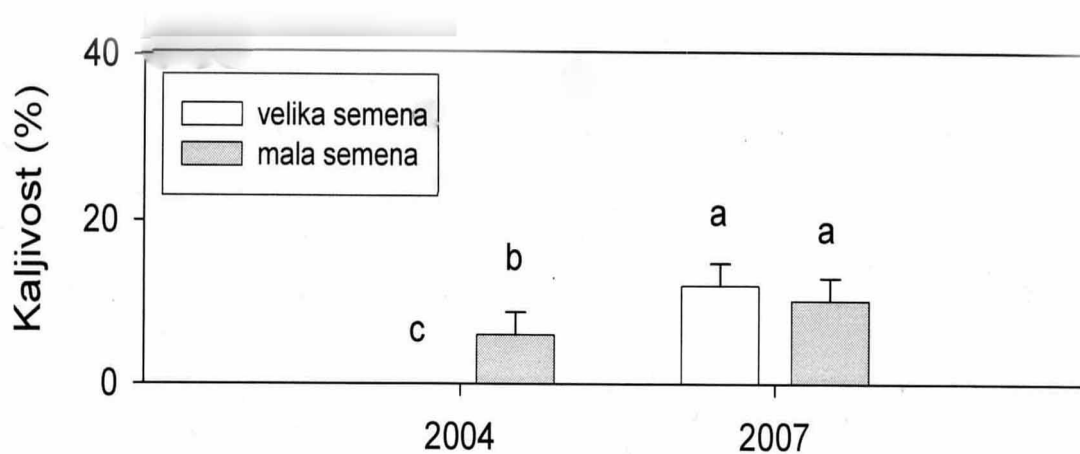
Za testiranje vplivov različnih načinov sterilizacije smo naredili poskus tako z natrijevim hipokloritom kot z vodikovim peroksidom. Natrijev hipoklorit je le upočasnil okužbo, vendar so se znaki plesni pojavili že naslednji dan (tabela 2). Vodikov peroksid pa je bil ob uporabi avtoklaviranih pincet, vode in filter papirja, najboljši. Ta način smo zato uporabili pri vseh nadaljnjih kalitvah.

Tabela 2: Različni načini sterilizacije, ki smo jih preizkusili preden smo začeli kalit semena. V tabeli so prikazani načini sterilizacije, ki smo jih uporabili ter po koliko dneh se je pojavila plesen.

Način sterilizacije	Uspešnost sterilizacije
brez sterilizacije	Močno plesnenje po enem dnevu
0,52 % natrijev hipoklorit	Sledovi plesni po enem dnevu, močno plesni po šestih
10 % vodikov peroksid	Le sledovi plesnenja po trinajstih dneh
10 % H ₂ O ₂ in avtoklavirana voda, pincete in filter papir	Plesen se ne razvije

4.2.2 Vpliv dolžine shranjevanja na kalitev semen

V tem poskusu smo kalili semena, ki smo jih nabrali septembra 2007, ter semena nabrana leta 2004. Semena nabrana leta 2004 so bila shranjena v hladilniku tri leta medtem, ko smo semena nabrana septembra 2007 kalili brez predhodnega shranjevanja.

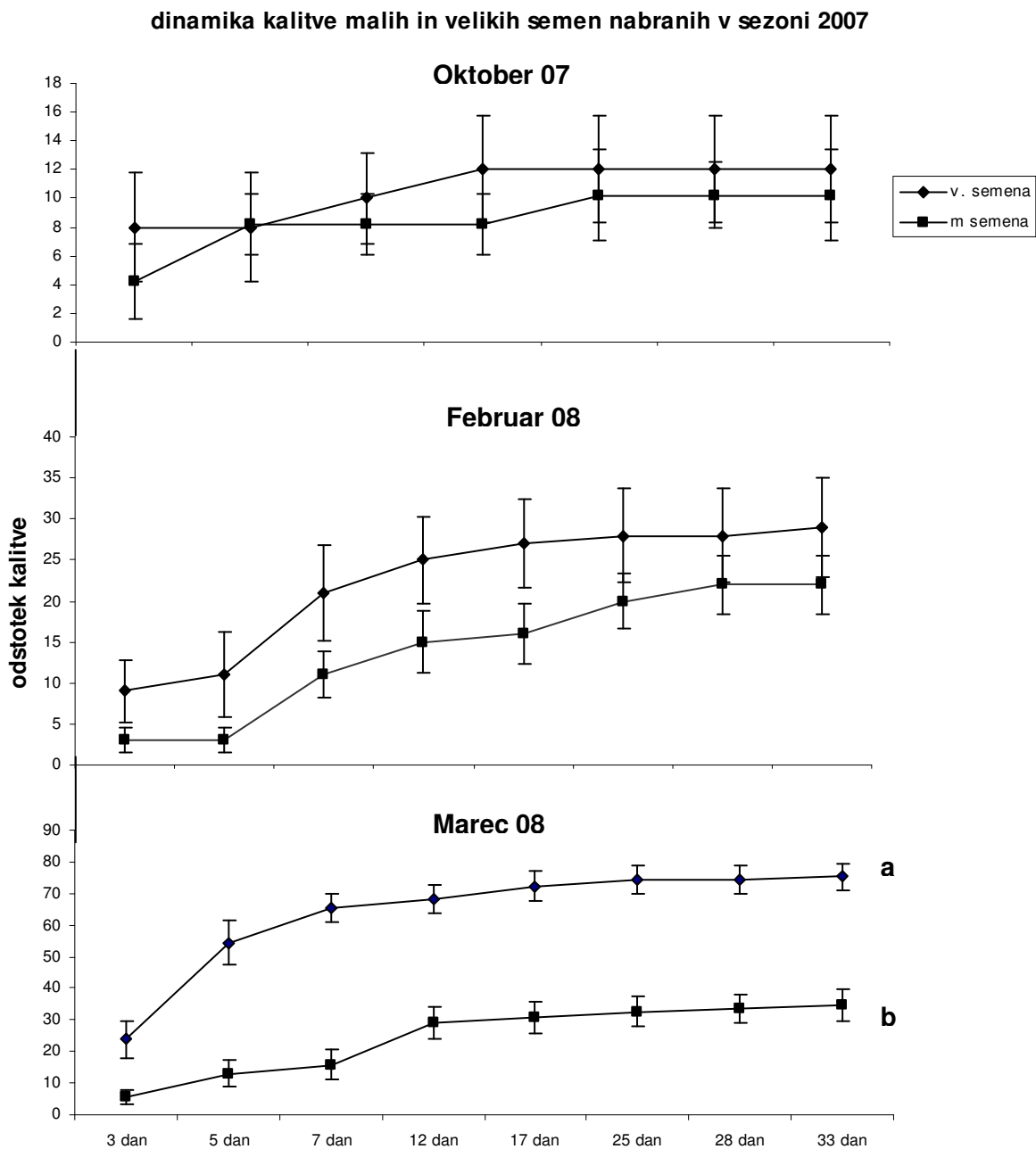


Slika 4: Končna kalitev semen iz leta 2004 in 2007, ki smo jih dali kalit 18.10.2007. (SV \pm SN, n = 50). Enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post hoc test. Različne črke označujejo statistično značilno razliko pri $p < 0,05$.

Rezultati iz leta 2004 potrjujejo, da mala semena z dormantnostjo povečajo dolgoživost in lahko prispevajo k semenski banki več let, velika pa ne. Opazna je bila velika razlika v kaljivosti med semeni nabranimi leta 2004 in tistimi nabranimi 2007 (slika 4). Tako majhna kot velika semena iz leta 2007 so bolje kalila od tistih iz leta 2004. Velika semena prispevajo v glavnem h kalitvi prvo sezono po sprostitvi iz rastlin. Velika semena iz leta 2004 do konca poskusa niso kalila, medtem ko so velika semena iz leta 2007 imela boljšo kaljivost od majhnih.

4.2.3 Vpliv velikosti semen na kalitev

Za testiranje vpliva velikosti semen na kalitev smo kalili tako velika kot majhna semena nabrana konec septembra 2007. Poskus smo ponovili različne mesece v sezoni 2007 in 2008



Slika 5: Dinamika kalitve malih in velikih semen, ki smo jih dali kalit različne mesece v rastni sezoni 2007/08. (SV \pm SN, n = 10). Predvsem v prvem tednu marčevega poskusa je videti povečana strmina krivulje kalitve velikih semen

Test kaljivosti oktobra 2007: Velika in majhna semena osočnika smo kalili mesec dni po nabiranju. Pri tem nismo opazili statistično značilnih razlik v kaljivosti med obema

velikostnima razredoma semen. Velika semena so največ kalila prvih 18 dni. V tem poskusu je bila povprečna kaljivost semen ob zaključku poskusa po 33ih dneh kalitve okoli 10 %.

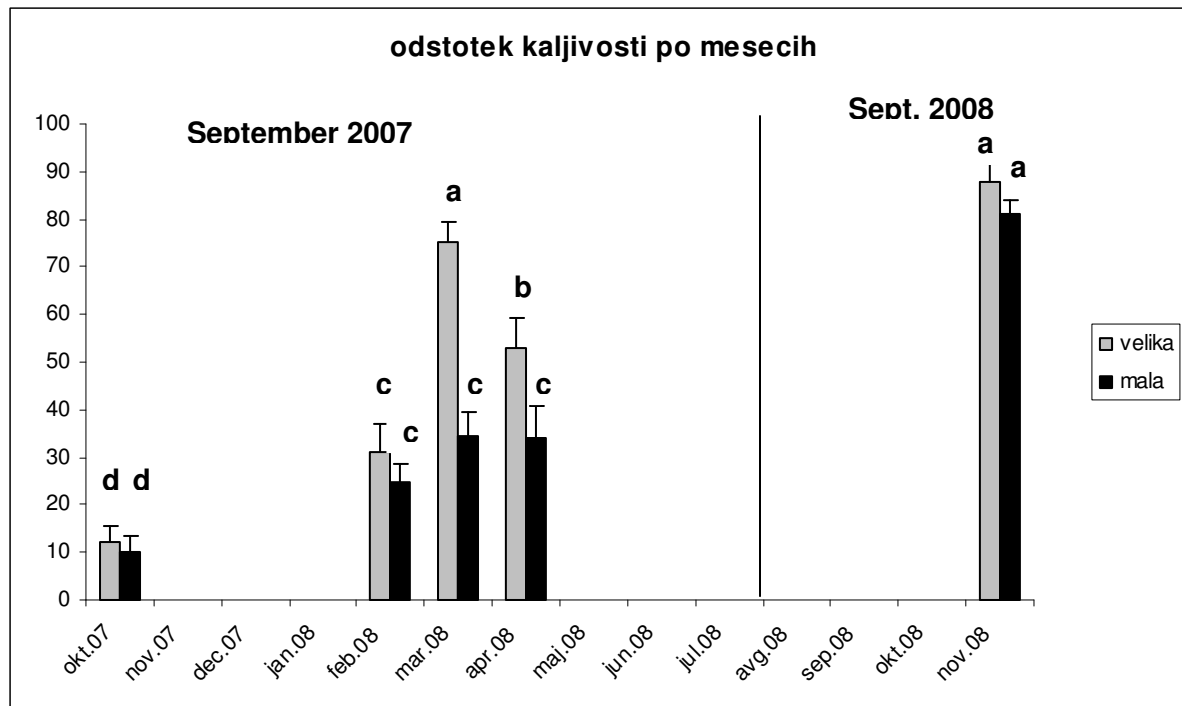
Test kaljivosti februarja 2008: Pet mesecev po nabiranju se je pokazalo nekaj razlik v kalitvi med malimi in velikimi semeni, vendar razlike niso bile statistično značilne. Največji odstotek kalitve je bil opazen v prvih 14 dneh poskusa. V tem poskusu je bila povprečna kaljivost semen ob zaključku poskusa po 33ih dneh kalitve okoli 25 %.

Test kaljivosti marca 2008: Šest mesecev po nabiranju so prvič opazne statistično značilne razlike v kalitvi. Večina velikih semen je kalila že po 7 dneh, medtem ko so majhna semena v večini vzkalila do 12 dneva. V tem poskusu je bila povprečna kaljivost velikih semen ob zaključku poskusa po 33ih dneh kalitve 75 %, medtem ko so mala semena imela kaljivost okoli 35 %. Indukcija dormance malih semen je verjetni mehanizem, s katerim mala semena prispevajo k semenski banki v tleh.

Semena nabrana leta 2007 so marca imela značilno boljšo kalitev velikih semen glede na mala (slika 5). Pri tem poskusu smo opazili, da so velika semena spomladi hitreje kalila od malih. Predvsem v prvem tednu poskusa je marca opazna večja kalitev.

4.2.3.1 Sezonska dinamika kalitve:

Pri tem poskusu smo primerjali končne odstotke kalitve semen, ki smo jih nabrali konec septembra 2007 in kalili v različnih mesecih rastne sezone. Zadnja dva stolpca pa predstavljata končni odstotek kalitve velikih in malih semen nabranih konec septembra 2008, ki smo jih kalili novembra 2008.



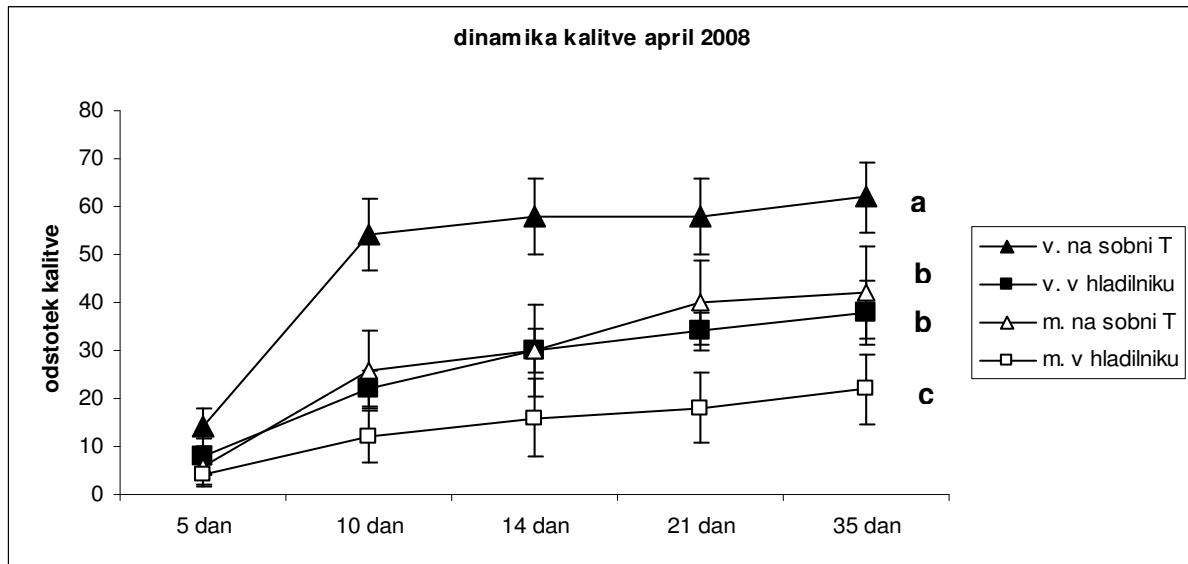
Slika 6: Končni odstotek kaljivosti velikih in malih semen z začetkom poskusov v oktobru, februarju, marcu, aprilu in novembru. (SV ± SN, n = 10). Semena, ki smo jih kalili novembra 2008 smo nabrali septembra 2008.

Najuspešnejša kalitev je bila pri semenih nabranih leta 2008. Semena iz leta 2007 so najbolj kalila marca, najslabše pa oktobra (slika 6). Predvsem velika semena iz leta 2007 imajo značilno tendenco povečanja kalitve od oktobra do marca ter znižanje v aprilu. Pri majhnih semenih je tudi prišlo do značilno večjega odstotka kalitve semen v marcu, vendar je ta ostal približno enak tudi v aprilu.

Razlike v kaljivosti med semeni nabranimi septembra 2007 in septembra 2008 kažejo tudi na velik vpliv razlik med posameznimi leti razvoja na kalitev, ki so po vsej verjetnosti odvisne od razlik v okoljskih dejavnikih med razvojem (temperature, padavine).

4.2.4 Vpliv temperature shranjevanja na kalitev semen

Pri tem poskusu smo primerjali kalitev semen nabranih septembra 2007 in shranjenih do poskusa v hladilniku s kalitivjo semen shranjenih na sobni temperaturi. Semena smo dali kalit aprila sedem mesecev po nabiranju.



Slika 7: Dinamika kalitve velikih in malih semen, ki smo jih dali kalit konec aprila 2008. (SV \pm SN, n = 5). Krivulja velikih semen shranjenih na sobni T je na začetku strma, nato pa položna. Ostale krivulje se počasi in postopoma višajo. Najbolje kalijo velika semena shranjena na sobni T. Med kalivostjo velikih semen iz hladilnika in malih semen shranjenih na sobni T ni statistično značilnih razlik. Najmanjšo kaljivost pa imajo mala semena shranjena v hladilniku.

V prvih 10 dneh je bila opazna statistično značilna razlika v kalitvi med semeni shranjenimi v hladilniku ter tistimi shranjenimi na sobni temperaturi. Predvsem kaljivost velikih semen shranjenih na sobni temperaturi je bila v tem času visoka, medtem ko je pri semenih iz hladilnika kalitev manjša in bolj postopna (slika 7). V tem poskusu je bila povprečna kaljivost semen ob zaključku poskusa po 35 dneh kalitve okoli 60 % za velika semena shranjena na sobni temperaturi. Mala semena shranjena na sobni temperaturi ter velika semena shranjena v hladilniku so imela podobno kalitev ves čas trajanja poskusa in sicer okoli 40 %. Mala semena iz hladilnika so najslabše kalila, saj je kalilo le okoli 20 % semen.

Rezultati nakazujejo velik pomen temperature ob kalitvi na dormanco semen. Nizka temperatura pripomore k zadrževanju semen v semenski banki.

4.3 Rast kalic

4.3.1 Rast kalic v petrijevkah

Rastline, ki so uspešno kalile februarja, marca in aprila 2008 iz semen nabranih septembra 2007, smo prenesli v petrijevke z vermikulitom, kjer smo jih razdelili glede na način zalivanja. Del kalic smo zalivali z $\frac{1}{4}$ x Hoaglandovo raztopino brez dodane soli, del pa smo zalivali z $\frac{1}{4}$ x Hoaglandovo raztopino z dodanim 0,5 % NaCl. Rastline smo vzgajali v topli komori pri 16/8 h dnevno/nočni ritmiki in pri 22-25°C.

V času rasti kalic v petrijevkah ni bilo opazne nobene razlike v rasti med kalicami zalitimi le s hranili in tistimi zalitimi z NaCl. Poskus smo ponovili trikrat in sicer s semeni, ki so kalila februarja, marca in aprila, vendar razlike v rasti nismo opazili v nobeni ponovitvi..

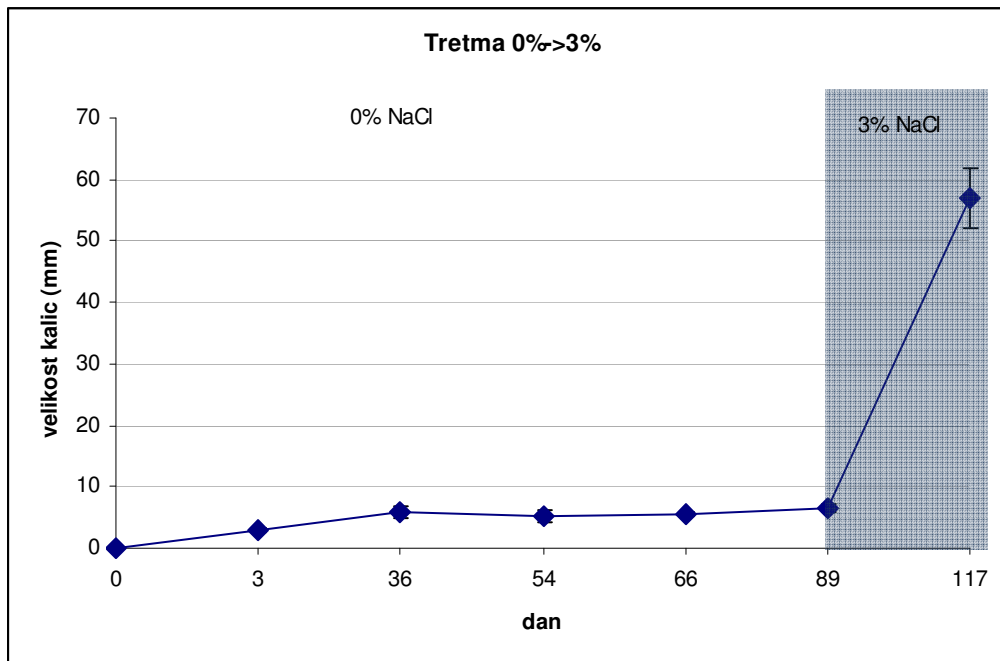
4.3.2 Vpliv dodatka soli na rast kalic v posodah



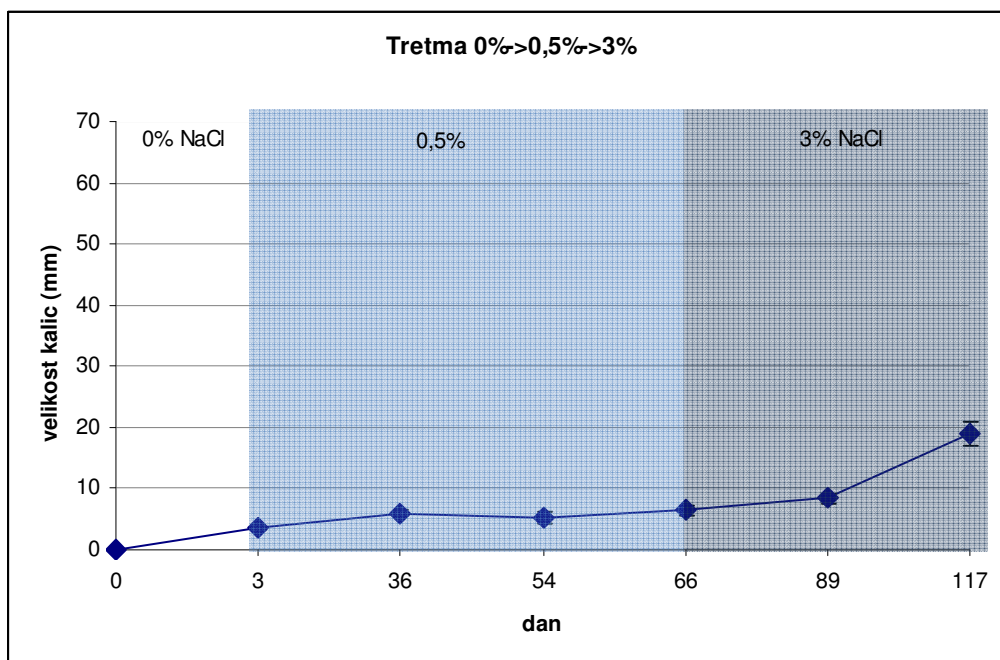
Slika 8: Rast kalic v posodah

Kalice smo po določenem času rasti v petrijevkah prenesli v posode, kjer so nadaljevale rast (slika 8). Za ta poskus smo uporabili kalice, ki so kalile marca in aprila iz semen nabranih septembra 2007. Kalice smo vzgajali na dva načina. Ene smo vzgajali tako, da smo jih zalivali le s hranili, enim pa smo dodali NaCl, tako da smo tekom poskusa zvišali koncentracijo od 0,5-3 %. Med tretmajema ni bilo nobene statistično značilne razlike v rasti kalic. Po okoli

89ih dneh poskusa smo dodali 3 % NaCl tudi rastlinam, ki so do takrat rasle samo na hranilih (slika 9). Ob dodatku soli so kalice močno povečale rast.



Slika 9: Rast kalic, ki so dlje časa rasle na kontrolnem substratu in smo jih na koncu poskusa zalili s 3 % koncentracijo NaCl (SV \pm SN, n = 4).



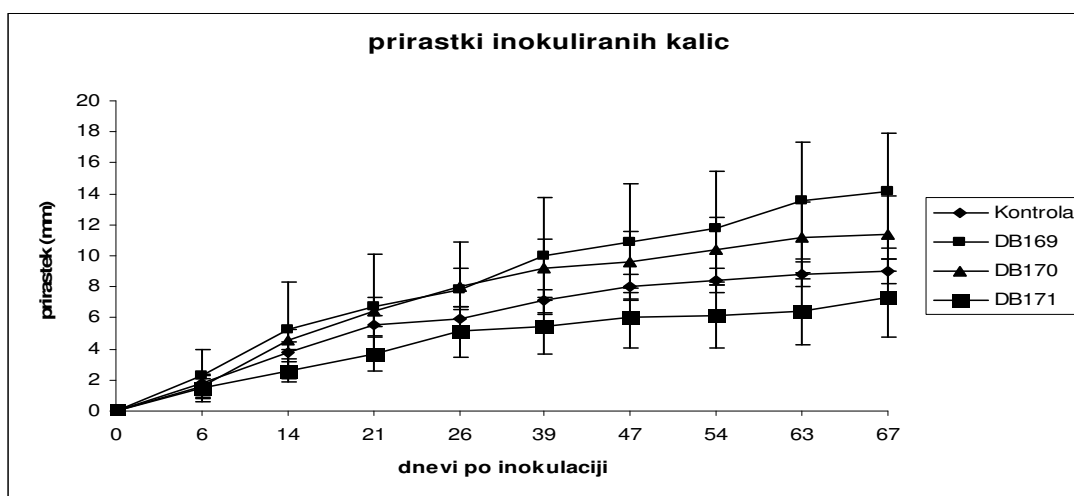
Slika 10: Rast kalic, ki smo jih sprva vzgajali na 0,5 % koncentraciji NaCl in nato na 3 % koncentraciji (SV \pm SN, n = 4).

Pri kalicah, ki smo jih po daljšem času zalivanja samo s hranili začeli zalivati s 3 % NaCl je bil opažen izredno pozitiven učinek soli. Njihova dolžina se je ob tej spremembi povečala za

več kot petkrat. Aprilskim kalicam se je rast kalic ob prehodu iz hranil na sol povečala iz povprečno 6,5 na 57 mm. Kalice, ki so že od začetka bile zalite z NaCl so tudi povečale svojo rast v tem obdobju vendar v precej manjši meri (slika 10). Trendi rasti so bili enaki tako pri kalicah, ki so kalile marca kot pri kalicah, ki so vzkalila aprila.

4.4 Prirastki inokuliranih kalic

Pri tem poskusu smo inokulirali izolate avtohtonih gliv navadnega osočnika h koreninam kalic, ki smo jih vzgojili v laboratoriju. Zanimalo nas je ali bodo kalice pod vplivom inokuliranih gliv izboljšale svojo rast. Pri prvem poskusu smo inokulirali starejše kalice iz poskusa vpliva soli, medtem ko za drugi poskus smo uporabili nove, mlade kalice iz semen nabranih septembra 2008, ki so kalile novembra 2008, ter bile vsajene na inokulate v zgodnji fazi razvoja. Rezultati poskusov se niso bistveno razlikovali.

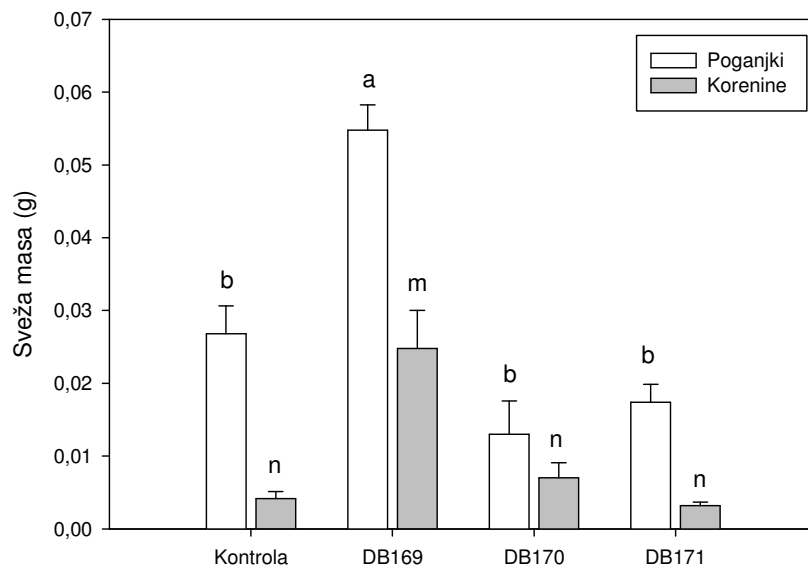


Slika 11: Drugi poskus meritev prirastkov kalic, prestavljenih direktno iz petrijevke v posode z inokulati gliv DB169, DB170 in DB171, brez predhodne rasti na vermikulitu ter prirastki kalic na kontroli. (SV \pm SN, n = 5)

Zaradi velike variabilnosti v rasti kalic osočnika nismo pri obeh poskusih opazili statistično značilnih vplivov inokulacije na rast osočnika (slika 11). Kljub temu pa smo v obeh poskusih pri inokulaciji z izolatom DB169 opazili močno izboljšano rast nekaterih kalic, ki so dosegle kar 2-kratno višino kontrole.

4.4.1 Vpliv inokuliranih izolatov na spremembo mase poganjkov in korenin

Po končanem poskusu rasti osočnika na inokulatih gliv, smo stehali maso korenin in poganjkov rastlin, da bi ugotovili morebitne spremembe, ki bi lahko bile posledica vpliva izolatov na rastlino.



Slika 12: Mase korenin in poganjkov kalic navadnega osočnika, ki so rasle na različnih tretmajih drugega poskusa inokulacije. DB169- rastline inokulirane z izolatom DB169, DB170- rastline inokulirane z izolatom DB170, DB171- rastline inokulirane z izolatom DB171, K- kontrola. (SV \pm SN, n = 5).

Vpliv izolatov se je videl predvsem na masi poganjkov in korenin izolata DB169 (slika 12). Kalice, ki so rasle na tem izolatu, so imele dvakrat večjo maso poganjkov ter precej večjo maso korenin tako od kontrolnih rastlin kot od rastlin na izolatih DB170 in DB171. Slednja izolata nista dala nobene statistično značilne spremembe mase korenin in poganjkov.

4.4.2 Pregled znakov glivne infekcije:

Rastline, iz prejšnjega poskusa, ki smo jih inokulirali z izolati gliv, smo na koncu še pregledali za znake infekcije. Ob pregledu preparatov korenin kalic nismo opazili značilnih mikoriznih struktur. Ker lahko pride do kolonizacije s temnimi septiranimi endofiti tudi v prevajalnih elementi in poganjku, smo dodatno pobarvali še poganjke, vendar zaradi debeline preparatov nismo mogli potrditi/ovreči prisotnosti glivnih struktur. Rastline prvega poskusa smo inokulirali po daljšem obdobju rasti, zato so bile inokulirane le 64 dni preden smo pregledali mikorizo. Pri drugem poskusu so bile rastline iz leta 2008, kmalu po kalitvi prenesene na inokulate in so na njih rasle 111 dni preden smo jim pregledali mikorizo.

5 DISKUSIJA

5.1 Endofiti

5.1.1 Identifikacija in določitev DNA sekvenc

Sekvenciranje ITS regije rDNA je pokazalo, da sta izolata DB169 ter DB170 genetsko najbolj sorodna glivam iz rodu *Fusarium*. Izolata sta se po videzu in vplivu slanosti na rast precej razlikovala. Sekvenca tretjega izolata DB171 je bila identična sekvenci izolata DB170.

Fusarium je širok rod filamentoznih gliv. Večina vrst je neškodljivih saprobov in so relativno številčni člani talne mikrobne združbe (Mycology Online, 2011), zato ni presenetljivo da se nahaja tudi v Sečoveljskih solinah. Vrste rodu *Fusarium* najdemo v tleh in na rastlinskem tkivu povsod na svetu. Medtem, ko je večina vrst bolj pogosta v tropskih in subtropskih predelih, nekatere naseljujejo tla v hladnih klimatih (Doctorfungus, 2007).

5.1.2 Toleranca izolatov na slanost

Vsi trije izolati gliv so najbolje rasli na osnovnem gojišču krompirjeve dekstroze. Da bi preverili toleranco, smo jih vzgajali na kontroli brez soli, na gojišču z dodanim 5 % NaCl in 17 % NaCl ter gojišču s 50 % koncentracijo saharoze. Slednjega smo uporabili za primerjavo s 5 % NaCl, saj imata enak vpliv na vodni potencial a različen ionski vpliv. Izolat DB169 je najbolje rasel, tako na kontroli, kot na 5 % NaCl. Ostala izolata sta kazala negativni učinek slanosti. Z rastjo izolata DB169 na koncentraciji soli višji od morske vode (v povprečju 38 promilov, vir: KPSS, 2006) smo ugotovili, da bi bil ta izolati uspešen tudi v bližini morja. Mnogo poskusov izboljšanja rasti rastlin v slanih razmerah s pomočjo mikoriznih gliv, poteka na slanosti nižji od 1 % (Calvo-Polanco in sod, 2009; Feng in sod., 2002; Jahromi in sod., 2008; Kaya in sod., 2009; ZhongQun in sod., 2007). Le redki poskusi uporabijo višje koncentracije. Bandou s sod. (2006) so v 3 % raztopini NaCl poskusili uporabiti ektomikorizno glivo *Scleroderma bermudense* za izboljšavo rasti vrste *Coccoloba uvifera*. Pri tej koncentraciji se je kolonizacija gliv zmanjšala, vendar je pozitiven učinek na rastlino ostal. Pri *in vitro* poskusu tolerance mikorizne glive *Glomus intraradices* je Jahromi s sodelavci (2008) opazil dobro rast glive pri koncentraciji do 0,3 % NaCl. V našem primeru, kjer je izolat DB169 rasel na 5 % koncentraciji, je prikazal veliko mero odpornosti na slanostni stres. S tem je izolat DB169 pokazal velik potencial, da bi lahko bil ključen pri izboljšanju razmer za rast osočnika v slanem okolju.

5.2 Kalitev

Iz literature je znano, da navadni osočnik lahko kali v slanem okolju, vendar je kaljivost bistveno večja v destilirani vodi (Lotschert, 1970). Ungar (1977) je ugotovil, da je največja kaljivost osočnika v destilirani vodi pri 25 °C (Ungar, 1977), zaradi česar smo tudi v naših poskusih uporabili enake razmere.

5.2.1 Način sterilizacije

Pred kalitvijo semen smo pregledali ali je potrebna njihova sterilizacija ter katero sterilizacijsko sredstvo je najboljše. Nesterilizirana semena so v roku enega dneva že močno plesnela, zaradi česar smo testirali tudi dve sterilizacijski sredstvi in sicer natrijev hipoklorit (NaClO), ki sta ga uporabila Khan in Weber (1986) ter vodikov peroksid (H₂O₂). Uporaba natrijevega hipoklorita je sicer zmanjšala okužbo, vendar je bilo stanje semen po šestih dneh enako kot v nesteriliziranih petrijevkah. Slabost te metode je, da so semena le eno minuto v sterilizacijskem sredstvu. Verjetnost, da se semena niso dovolj sterilizirala je pri tem večja, kot če so semena dlje v sterilizacijskem sredstvu. Ob uporabi vodikovega peroksida je bilo, v primerjavi z drugim tretmajem, pojavljanje plesni precej manjše. Pet minut namakanja v vodikovem peroksidu je omogočilo boljše delovanje sterilizacijskega sredstva in zmanjšalo obseg mogočih napak. Učinkovitost vodikovega peroksida se je izkazala za boljšo, tako da smo jo uporabili pri vseh nadaljnjih poskusih. Da bi še izboljšali sterilnost smo uporabili avtoklavirane pincete, vodo in filtrirni papir, ki so dokončno odpravili plesen.

5.2.2 Vpliv dolžine shranjevanja na kalitev semen

Primerjava kalitve semen iz leta 2004 in 2007 nam je pokazala, da se semenom z leti zmanjša kaljivost. Posebej očitna je razlika med velikimi semeni, saj semena iz leta 2004 sploh niso kalila. To potrjuje ugotovitve iz različnih člankov (Carter in Ungar, 2003; Davy in sod., 2001; Berger, 1985), da velika semena služijo kalitvi iste rastne sezone, medtem ko mala semena so shranjena v semenski banki in lahko kalijo v naslednjih sezonah. Velika semena so v treh letih izgubila vso vitalnost, medtem ko so majhna semena ostala dormantna in se tako ohranila do kalitve. Tudi kaljivost malih semen iz leta 2004 je bila nižja od semen leta 2007. Razloge za to bi lahko iskali v pogojih shranjevanja. Za dobro ohranjanje semen moramo paziti tako na temperaturo kot na svetlobo in vlažnost prostora (Tarre in sod., 2007; Balešević-Tubić in sod., 2010). Lahko, da smo s shranjevanjem ustvarili pogoje za sekundarno dormanco, ki se ni

prekinila ob kalitvi. Seveda pa ne moremo izključiti možnosti, da je bila vitalnost semen iz leta 2004 slabša že od začetka, saj tistega leta ni bil opravljen preizkus kaljivosti oz. viabilnosti.

5.2.3 Vpliv velikosti semen na kalitev

Pri vseh poskusih se je kot najpomembnejši dejavnik uspešnosti kaljivosti izkazala velikost semen. Največja razlika se je kazala v marcu, ko so velika semena dosegla maksimalno kaljivost. Razlike v kalitvi pri malih semenih so manjše. Ni tako očitnega vrha kalitve spomladi kot pri velikih. Kljub temu pa je tudi pri majhnih semenih opazna podobna krivulja tekom sezone. Poskus je nakazal, da bi lahko predvsem pri velikih semenih obstajala inhibicija kaljivosti, ki zgodaj spomladi popusti. Razlaga, da dormance pri semenih iz leta 2008, ki smo jih kalili pozno jeseni nismo opazili, bi lahko bila ta, da se še ni razvila (glej 5.2.4 sezonska dinamika), ko smo rastline odtrgali in da nastane šele v zadnji fazi razvoja semen (Bewley, 1997). Morda pa so semena pozno jeseni le izstopila iz primarne dormance in ker v tem obdobju niso bila izpostavljena nizkim temperaturam, se še ni tvorila pogojna dormanca (Huiskes in sod., 1985).

Razlike v kaljivosti med malimi in velikimi semeni potrjujejo teorijo o drugačni strategiji razvoja semen pri različnih velikostih. Različne zahteve za kalitev semen omogočijo osočniku, da bolje izkoristi okoljske vire. Velika semena, s K strategijo uporabljajo okoljske vire v času rastne sezone. V tem času se pojavi K tip selekcije na rastlino, saj zaloge dobrin omejujejo rast populacije (Jerman, 1999). Ta semena skrbijo za vsakoletno ohranjanje populacije v običajnih razmerah. Pomanjkanje padavin in visoka slanost tal lahko prepreči naselitev zgodnjim velikim semenom ali vsem semenom tistega leta. Naslednje leto je na tem območju veliko dobrin, ki niso bile izkoriščene v prejšnji sezoni. Majhna semena v semenski banki imajo tako priložnost, da se hitro namnožijo na širšem območju brez omejitve zaradi pomanjkanja hrane. S semensko banko ali r strategijo malih semen si lahko osočnik zagotovi ponovno naselitev populacije v tem in naslednjih letih (Philipupillai in Ungar, 1984).

5.2.4 Sezonska dinamika kalitve

Zaradi primarne dormance večina semen v oktobrskem poskusu ni kalila (Davy in sod., 2001). Do marca, s prenehanjem dormance, se je kaljivost povečala. Kaljivost se je konec aprila spet zmanjšala, lahko zaradi slabše viabilnosti velikih semen ali ponovnega vstopa v dormanco malih semen (Carter in Ungar, 2003). Semena naslednje sezone, ki smo jih dali kalit

novembra, so imela visok odstotek kaljivosti tako velikih kot malih semen okoli 85 % in 75 %, kar lahko pomeni, da semena še niso vstopila v dormanco. Morda pa smo s sušenjem matičnih rastlin leta 2008 nehote prekinili dormanco semen in je to razlog za visoko kalitev. Lahko pa je bila kaljivost semen boljša, ker smo jih nabrali iz mlajših rastlin kot leto poprej. V dveh populacijah vrste *Kochia americana* v državi Utah se je z obdobjem nabiranja semen spreminjal odstotek kaljivosti (Clark in West, 1969). Ena populacija je bolje kalila, če so jo nabrali septembra, druga pa oktobra. Semena vrste *Spergularia marina* nabrana v različnem času rastne sezone imajo različno stopnjo dormance, ki je odvisna od meseca nabiranja (Ungar, 1988). Podobno smo opazili tudi v našem primeru. Rastline nabrane za naš poskus so se nahajale na razdalji okoli 100 m², kar bi lahko pomenilo, da so bili osočniki iz leta 2007 in 2008 predstavniki različnih populacij.

Razlike v kaljivosti med leti 2007 in 2008 bi lahko bile odvisne od pogojev, ki jih je imela matična rastlina v času razvoja. V letu 2008 je bilo tekom celega leta več padavin (ARSO), ki so omejile slanostni stres v času kalitve in razvoja rastlin. Pozimi je več dni temperatura segala pod 0 °C in s tem omogočila stratifikacijo semen. Med poletnimi meseci pa ni prihajalo do velikih nihanj v temperaturi, ki bi lahko vplivala na rast osočnika. Ob pogledu na te pogoje lahko ugotovimo, da so semena iz leta 2008 nabrana iz rastlin, ki so imela boljše pogoje za rast. Boljši pogoji so morda omogočili več semen z boljšo sposobnostjo za kalitev.

5.2.5 Vpliv temperature shranjevanja na kalitev semen

V mesecu aprilu smo primerjali tudi kaljivost semen glede na način shranjevanja. Tako majhna kot velika semena, ki smo jih do kalitve imeli shranjena na sobni temperaturi so bolje kalila od semen shranjenih v hladilniku. Razlog je verjetno v tem, da se navadni osočnik nahaja na Primorskem, kjer so značilne višje temperature in so zato tudi semena bolj prilagojena na višje temperature.

5.3 Vpliv slanosti na rast in razvoj kalic

Vpliv slanosti na rast kalic smo preverili tako, da smo merili dolžine kalic, ki smo jih zalivali z raztopino NaCl (0,5-3 %) ter kalic zalitih z vodo (kontrola). Primerjava je pokazala, da smo edini pozitivni učinek NaCl opazili šele ob prenosu kalic iz kontrole na 3 % koncentracijo NaCl. V času primerjave rasti so sicer kalice zalite z NaCl rasle malo bolje od kontrolnih. Ko pa smo slednje na koncu poskusa dali na 3 % NaCl, se je njihova rast naglo povečala.

V tem času se je sicer povečala tudi velikost kalic, ki so bile že dlje časa na 3 % koncentraciji vendar v manjši meri. To bi lahko pomenilo, da izboljšana rast ni nujno posledica višje slanosti v prsti. Lahko, da je odvisna od sezone, vendar jo velika sprememba v slanosti še dodatno vzpodbudi. McGraw in Ungar (1981) sta ugotovila, da je osočnik tvoril malo suhe mase na začetku in sredi poletja nato pa povečal rast avgusta. Obdobje največje rasti naj bi bilo tik pred dozoritvijo. Naglo rast morda omogoči ravno povečanje temperatur in evaporacije v juliju in avgustu zaradi česar se poveča slanost voda. Rastline osočnika dokazano bolje kalijo v vodi brez dodatne soli, tudi začetna rast se v okolju brez soli bistveno ne razlikuje od rasti na soli. Šele kasneje v razvoju se kaže velika potreba osočnika po soli. Pri vrsti *S. herbacea* je bila suha masa večja, če so rastlino zalivali z 1,5 % NaCl (Baumeister in Schmidt, 1962). Vrsta *S. europaea* na solinah v Ohio pa je zelo spreminjala suho maso glede na koncentracije soli v tleh (Riehl in Ungar, 1982).

Kot zanimivost velja omeniti življenjski cikel navadnega osočnika. Proti koncu poskusa so kalice cvetele, kljub temu da niso dosegle končne velikosti. To so opazili tudi pri taksonih *Lasthenia*. Daljše obdobje slanega stresa je povzročilo pospešitev in zgostitev življenjskega cikla. Rastline so zgodaj cvetele in so imele veliko cvetnih delov v razmerju z vegetativnimi (Kingsbury in sod., 1975). V našem primeru rastlina ni dokončala vegetativne rasti, kljub vsemu pa je zaključila življenjski cikel. V obeh ponovitvah poskusa so rastline cvetele približno štiri mesece po kalitvi, kar pomeni, da ni prišlo do pospešitve cikla, temveč le do cvetenja kljub nepopolnem vegetativnem razvoju.

5.4 Prirastki inokuliranih kalic

Primerjava rasti osočnika na glivnih izolatih je pokazala izboljšanje rasti na izolatu DB169.

Dejstvo, da so vidne statistično značilne razlike v rasti rastlin le pri izolatu DB169 sovpada z ugotovitvami iz poskusa tolerance glivnih izolatov na povečano slanost v gojišču. Za izolat DB169, kot predstavnik rodu *Fusarium*, ni dobro poznanih pozitivnih učinkov, saj so pri številnih rastlinskih vrstah odkrili različne učinke.

Sikora in sod. (2008) so pokazali, kako so različni nepatogeni sevi rodu *Fusarium* pomagali izboljšati zaščito rastlin banane in paradižnika pred določenimi vrstami glist. Čeprav so različne vrste tega rodu tudi rastlinski patogeni, pa lahko predstavljajo nekatere nepatogene endofite. Pri tem imajo slednje pozitivne učinke za rastlino, saj je bilo opaženo, da je nepatogena linija *Fusarium oxysporum* preprečevala razvoj patogenih linij preko kompeticije za rizosferski ogljik, prostor in okužena območja na površini korenine (Selosse in sod., 2004). Odkrita je bila tudi močna kolonizacija gliv rodu *Fusarium* na rastlinah kakavovca. Dominantnost te skupine je nakazala, da bi lahko te glive imele pomembno vlogo v njihovem razvoju (Rubini in sod., 2005).

Fusarium bi lahko pozitivno vplival na rast navadnega osočnika z delovanjem na rizosfero kalic. Med drugimi bi lahko bili pozitivni učinki delovanja glive na rizosfero kalic osočnika posledica spremembe sestave mikrobne populacije v okolici glivnih hif. Smith in Read (2008) sta pokazala, da so tudi ektomikorizne glive aktivno udeležene pri dekompoziciji v tleh in s tem pomembne za povečanje nutrientov (Vilhar, 2001). Kolonizacija korenin z mikoriznimi glivami omogoča agregacijo tal, ki je pomembna za ustvarjanje prostorov, v katerih se lahko nabira voda in tvori atmosfera (Rosemeyer in sod., 2000). Xu in Wu (2009) sta odkrila, da ektomikoriza pri borovcih poveča relativno prostornino tal in občutno zmanjša stopnjo venenja vrste *Pinus massoniana*. V našem poskusu so morda hife gliv povečale kompaktnost zemlje in s tem izboljšale zadrževanje vode v tleh. Z izboljšanimi pogoji za vodo in pline v tleh so tudi hranila lažje dostopna. Obenem bolj kompaktna podlaga omogoča boljše zakorenenjenje.

5.4.1 Pregled znakov glivne infekcije

Ob pregledu koreninskih preparatov nismo opazili glivne kolonizacije mikorize. Iz tega sledi, da je pozitiven vpliv inokulacije z izolatom DB169 posledica delovanja na rizosferna tla rastlin ali da je prišlo do kolonizacije nadzemnih delov rastline. Barrow (2003) je opazil močno kolonizacijo vrste *Bouteloua sp.* z DSE glivami v prevodnem tkivu rastline. Iz tega smo sklepali, da bi se morda v poganjku, kjer je prevodno tkivo večje bolje videla kolonizacija gliv, saj so korenine naših rastlin bile majhne in tanke. Poganjke smo sicer poskusili pobarvati, vendar so med procesom razpadli in niso bili uporabni za ugotavljanje prisotnosti glivnih endofitov. Mnoge strukture je Barrow (2003) videl šele z barvanjem s sudan IV, ter pod več kot 1000kratno povečavo. Strukture, ki se z našim načinom barvanja niso mogle videti.

6 SKLEPI

Potrdili smo hipotezo, da so mala semena navadnega osočnika za razliko od velikih sposobna kaliti tudi v obdobju večih let. Velika semena so v obdobju treh let zgubila vso vitalnost, medtem ko so mala semena ohranila določeno stopnjo kaljivosti.

Potrdili smo hipotezo, da je kalitev velikih semen spomladi večja kot jeseni. Kljub temu, da je v pomladnih mesecih prišlo do povečanja kalitve glede na jesen tudi pri majhnih semenih, je bilo to povečanje bistveno manjše kot pri velikih semenih. S tem smo pokazali različno vlogo dimorfnih semen pri osočniku.

Potrdili smo hipotezo, da se pri shranjevanju semen na nizkih temperaturah lahko inducira dormanca, saj so semena osočnika, ki so bila shranjena v hladilniku slabše kalila kot tista, ki so bila shranjena na sobni temperaturi.

Hipoteza, da kalice osočnika, ki rastejo na slanem okolju rastejo bolje od tistih, ki rastejo brez soli je bila le delno potrjena, saj se rast kalic, ki so rasle na soli, v zgodnji fazi razvoja ni bistveno razlikovala od tistih na substratu brez soli. Pozitivni učinek soli na kalice osočnika se je videl šele pri rastlinah navadnega osočnika, ki so rasle dlje časa na substratu brez NaCl in smo jim nato dodali 3 % vodne raztopine NaCl. Ob tem se jim je rast močno izboljšala. Pri vzgoji na 0,5 % raztopini pa je bil ob prehodu na 3 % učinek manjši. Torej je učinek NaCl na rastline pomemben šele v kasnejši fazi razvoja osočnika.

Uspešno rast avtohtonih glivnih endofitov izoliranih iz korenin osočnika na substratu z visoko koncentracijo soli smo uspeli potrditi le za izolat DB169. Pri izolatih DB170 ter DB171 smo to hipotezo ovrgli. Te ugotovitve sovpadajo z ugotovitvijo, da sta sekvenci DNA izolatov DB170 in DB171 identični. Vsi trije izolati so najbolj sorodni glivam rodu *Fusarium*.

Za izolat DB169 smo tudi potrdili hipotezo, da ob inokulaciji z avtohtonimi glivnimi endofiti se rast kalic izboljša. Ob povečanju rasti kalic sta se tudi masi poganjkov in korenin močno povečali.

7 POVZETEK

Za optimizacijo vzgoje navadnega osočnika moramo poznati določene lastnosti, ki vplivajo na njegovo rast in kalitev. Za navadni osočnik Sečoveljskih solin so značilna dimorfna semena. Pri dimorfnih semenih je značilno, da se pogoji za kalitev ter sama kalitev med različnimi semeni razlikujeta (Carter in Ungar, 2003). Velika semena navadnega osočnika v obdobju treh let izgubijo sposobnost kalitve, medtem ko jo mala semena v določeni meri ohranijo. Pomen velikih semen se najbolj kaže pri kalitvi v pomladnih mesecih, ko se le ta glede na jesen močno poveča. Za kalitev je zelo pomemben tudi način shranjevanja semena. Če semena iz okolja z visokimi temperaturami shranjujemo na nizki temperaturi, se lahko inducira dormanca in s tem se kalitev poslabša.

Znano je, da halofiti ne samo uspešno rastejo na slanem okolju, ampak sol tudi potrebujejo. Te rastline imajo razvite transportne mehanizme za kopičenje Na^+ v vakuoli (Xiong in Zhu, 2002), kjer sodelujejo pri osmotskem uravnavanju. Pri rasti kalic osočnika smo pokazali pozitivne učinke soli v kasnejšem obdobju njihovega razvoja, saj je bil učinek soli največji ob dodatku 3 % koncentracij NaCl kalicam, ki so dlje rasle na substratu brez soli. Pri kalicah, ki smo jih daljše obdobje vzgajali na soli in jim koncentracijo NaCl postopoma zviševali, je bil pozitiven vpliv soli manjši.

Glivni endofiti v slanem okolju imajo velik pomen pri zaščiti rastlin, tako s preskrbo rastlin z vodo (Selosse in sod., 2004) kot z ublažitvijo posledic ionskega stresa (Wu in sod., 2009). Avtohtoni glivni endofiti, ki se nahajajo v zgornjem delu korenin navadnega osočnika, so prilagojeni na visoke koncentracije soli. Ta izolat, soroden glivam rodu *Fusarium*, pomembno vpliva na rast osočnika. Kljub temu, da nismo mogli dokazati značilnih mikoriznih struktur, se je ob inokulaciji izolata osočniku poveča masa korenin in poganjkov ter v določeni meri tudi rast.

8 VIRI

ARSO (Agencija Republike Slovenije za okolje). RS Ministrstvo za okolje in prostor
http://www.arso.gov.si/vreme/podnebje/meteorolo%a1ki%20letopis/meteoroloski_letopisi.htm (4.10.2010)

Bajji M., Kinet J-M., Lutts S. 2002. Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedlings growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Can. J. Bot.* 80: 297-304

Balešević-Tubić S., Tatić M., Đorđević V., Nikolić Z., Đukić V. 2010. Seed viability of oil crops depending on storage conditions. *Helia*. 33 (52): 153-160
(<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1018-1806/2010/1018-18061052153B.pdf>)

Bandou E., Lebailly F., Muller F., Dulormne M., Toribio A., Chabrol J., Courtecuisse R., Plenchette C., Prin Y., Duponnois R., Thiao M., Sylla S., Dreyfus B., Ba A. M. 2006. The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza*. 16 (8): 559-565

Barrow J. R. 2003. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13:239–247

Baumeister W., Schmidt L., 1962. Über die rolle des natriums im pflanzlichen stoffwechsel. *Flora* 152. 24

Beauregard M. S, Hamel C., St -Arnaud M. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi communities in major intensive North American grain productions. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*: 135-157.

Berger A. 1985. Seed dimorphism and germination behaviour in *Salicornia patula*. *Vegetatio*. 61: 137-143

Bewley J. D. 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066

Calvo-Polanco M., Jones M. D., Zwiazek J. J. 2009. Effects of pH on NaCl tolerance of American elm (*Ulmus americana*) seedlings inoculated with *Hebeloma crustuliniforme* and *Laccaria bicolor*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31(3):515-522

Carter C. T., Ungar I. A. 2003. Germination response of dimorphic seeds of two halophyte species to environmentally controlled and natural conditions. *Can. J. Bot.* 81 (2003):918-926

Clark L. D., West N. E. 1969. Germination of *Kochia americana* in relation to salinity. *J. Range Manage.* 22: 286

Davy A. J., Bishop G. F., Costa C. S. B. 2001. *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. ramosissima* J. Woods, *S. europaea* L., *S. obscura* P.W. Ball and Tutin, *S. nitens* P.W. Ball and Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball and Tutin and *S. dolichostachya* Moss). *Journal of Ecology* 89: 681-707

Doctorfungus. 2007. DoctorFungus Corporation.

<http://www.doctorfungus.org/thefungi/fusarium.php> (21.10.2010)

Duan D., Liu X., Khan M. A., Gul B. 2004. Effects of salt and water stress on the germination of *Chenopodium glaucum* L., seed. *Pak. J. Bot.* 36(4): 793-800

Feng G., Zhang F. S., Li X. L., Tian C. Y., Tang C., Rengel Z. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* 12: 185-190

Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molec Ecol* 2: 113–118

Gardes M., Bruns T. 1996. Community structure of ectomycorrhiza fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* 74: 1572-1583

Garg N., Manchanda G., 2009. Role of arbuscular mycorrhizae in the alleviation of ionic, osmotic and oxidative stresses induced by salinity in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (pigeonpea). *Journal of Agronomy and Crop Science*. 195 (2): 110-123

Geister I., 2004. Sečoveljske soline/ Sečovlje salt pans. Ljubljana. Založba Kmečki glas: 151 str.

Glavina T. 2005. Diverziteta gliv nekaterih halofitov Sečoveljskih solin. Dipl. Delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za biologijo

Huiskes A. H. L., Stienstra A. W., Koutstaal B.P., Markusse M. M., van Soelen J. 1985. Germination ecology of *Salicornia dolichostachya* and *Salicornia brachystachya*, *Acta Botanica Neerlandica*, 34, 369-380

Jahromi F., Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J. M. 2008. Influence of salinity on the In vitro development of *Glomus intraradices* and on the In vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology*. 55: 45-53

Jerman I. 1999. Evolucija s teoretično biologijo. Ljubljana. ŠOU, Študentska založba. 143 str.

Jogan N., Martinčič A., Wraber T., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk. 3. izdaja. Ljubljana. Tehniška založba Slovenije

Kaya C., Ashraf M., Sonmez O., Aydemir S., Tuna A.L., Cullu M.A. 2009. The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia Horticulturae*. 121(1):1-6.

Khan M. A., Weber D. J., Hess W. M. 1985. Elemental distribution in seeds of the halophytes *Salicornia pacifica* var. *utahensis* and *Atriplex canescens*. *Amer. J. Bot.* 72(11): 1672-1675

Khan M. A., Weber D. J. 1986. Factors influencing seed germination in *Salicornia pacifica* var. *utahensis*. *Amer. J. Bot.* 73(8): 1163-1167

Kingsbury R. W., Radlow A., Mudie P. J., Rutherford J., Radlow R. 1975. Salt stress responses in *Lasthenia glabrata*, a winter annual composite endemic to saline soils. Can. J. Bot. 54: 1377

Koprivnikar M. 2008. Priprava vcepka za biološko čiščenje voda s povišano slanostjo. Dipl. Delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za biologijo

KPSS (Krajinski park Sečoveljske soline). 2006

http://www.kpss.si/si/o-parku/soline-in-solinarstvo/morje_2/slanost (29.6.2011)

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in bioinformatics 9(4): 299-306

Lotschert W. 1970. Keimung, Transpiration, Wasser- und Ionenaufnahme bei Glycophyten und Halophyten. Oecologia Plantarum. 5:287-300

McGraw D. C., Ungar I. A. 1981. Growth and survival of the halophyte *Salicornia europaea* under saline field conditions. Ohio J. Sci. 81: 109

Moghaieb R. E. A., Saneoka H., Fujita K. 2004. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. Plant Sci. 166(5): 1345–1349

Mycology Online. 2011. The University of Adelaide. (28.6.2011)

[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/) (29.6.2011)

Ogorelec B., Mišič M., Faganeli J. 2000. Sečoveljske soline- geološki laboratorij v naravi. Annales Ser. hist. nat. 10. 2000 .2(21): 243-252

Parka J., Okitab T. W., Edwardsa G. E. 2009. Salt tolerant mechanisms in single-cell C₄ species *Bienertia sinuspersici* and *Suaeda aralocaspica* (Chenopodiaceae). *Plant Science*. 176(5): 616-626

Pfeiffer C. M., Bloss H. E. 1987. Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in a saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization. *New Phytol.* 108:315-321

Philipupillai J., Ungar I. A. 1984 The effect of seed dimorphism on the germination and survival of *Salicornia europaea* L. populations. *Amer. J. Bot.* 71: 542-549

Phillips J. M., Hayman D. S. 1970. Improved Procedures for Clearing Roots and Staining Parasitic and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi for Rapid Assessment of Infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161

Pipan P., Sečoveljske soline. 2008. Dedi Enciklopedija naravne in kulturne dediščine na Slovenskem. <http://www.dedi.si/dediscina/430-secoveljske-soline> (2. 5. 2011)

Porras-Soriano A, Soriano-Martin M. L., Porras-Piedra A., Azcon R. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditios. *Journal of plant physiology* 166: 1350-1359

Rabie G. H. 2005. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and kinetin on the response of mungbean plants to irrigation with seawater. *Mycorrhiza* 15(3): 225-230

Riehl T. E., Ungar I. A. 1982. Growth and ion accumulation in *Salicornia europaea* under saline field conditions. *Oecologia*. 54. 193

Rozema J., Arp W., van Diggelen J., van Esbroek M., Broekman R., Punte H. 1986. Occurrence and ecological significance of vesicular arbuscular mycorrhiza in the salt marsh environment. *Acta Botanica Neerlandica*. 35: 457-467

Rosemeyer M., Viaene N., Swartz H., Kettler J. 2000. The effect of slash/mulch and alleycropping bean production systems on soil microbiota in the tropics. *Applied Soil Ecology*. 15(1): 49-59

Rubini M. R., Silva-Ribeiro R. T., Pomella A. W. V., Maki C. S., Araújo W. L., dos Santos D. R., Azevedo J. L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1: 24-33

Rubio-Casal A. E., Castillo J. M., Luque C. J., Figueroa M. E. 2003. Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. *Journal of Arid Environments*. 53: 145–154

Selosse M-A., Baudoin E., Vandenkoornhuysen P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C. R. Biologies* 327: 639–648

Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B.W., Zhang F.F., Huang Y.H. 2009. Influence of arbuscular mycorrhizae on the root system of maize plants under salt stress. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 879-886

Sikora R. A., Pocasangre L., zum Felde A., Niere B., Vu T. T., Dababat A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46: 15-23

Silveira J. A. G., Sandro S. A. M., Lima J. P. M. S., Viégas R. A. 2009. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany* 66: 1-8

Smith M. H., 1985. Life histories of annual plants in a heterogeneous salt marsh environment. PhD Thesis, University of East Anglia, Norwich, UK

Smith S. E., Read D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3. edition. San Diego, CA [etc.]. Academic press: 787 str.

Sonjak S, Glavina T, Udovič M, Regvar M, 2007. Fungal colonization of the roots of selected halophytes from Sečovlje salterns. *Acta Biologica Slovenica* 50: 5–17

Sonjak S., Beguiristain T., Leyval C., Regvar M. 2009. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. *Plant Soil* 314:25–34

Taiz L., Zeiger E. 2002. *Plant physiology*. 3. edition. Sunderland, Massachusetts, Sinauer associates, Inc., Publishers: 690 str.

Tarré E., Pires B. B. M., Guimarães A. P. M., Carneiro L. A., Forzza R. C., Mansur E. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. and *Dyckia* Schult. & Schult.f. species (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasílica*. 21(4): 777-783

Trošt-Sedej T. 2003. Navodila za vaje pri predmetu ekologija rastlin. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za biologijo

Trouvelot A., Kough J. L., Gianinazzi-Pearson V. 1986: Mesure de taux de mycorhization VA dun systeme racinaire. Recherche de methodes destination ayant une signification fonctionnelle. *Mycorrhizae: physiology and genetic* 216-222

Ungar I. A. 1967. Influence of salinity and temperature on seed germination. *The Ohio Journal of Science* 67(2): 120-123

Ungar I. A. 1977. Salinity, temperature, and growth regulator effects on seed germination of *Salicornia europaea* L. *Aquat. Bot.* 3: 329-335

Ungar I. A. 1988. Effects of the parental environment on the temperature requirements and salinity tolerance of *Spergularia marina* seeds. *Bot. Gaz.* 149: 432

Ushakova S. A., Kovaleva N. P., Gribovskaya I. V., Dolgushev V. A., Tikhomirova N. A. 2005. Effect of NaCl concentration on productivity and mineral composition of *Salicornia europaea* as a potential crop for utilization NaCl in LSS. *Adv. Space Res.* 36: 1349-1353

Vilhar U. 2001. Pestrost tipov ektomikorize na naravnem mladju smreke na Pokljuki Dipl. Delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, odd. za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–322. Academic Press, San Diego.

Wu Q.-S., Zou Y.-N., He X.-H., 2009. Contributions of arbuscular mycorrhizal fungi to growth, photosynthesis, root morphology and ionic balance of citrus seedlings under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum.* 32 (2): 297-304

Xiong L., Zhu J.-K. 2002. Salt tolerance. *The Arabidopsis Book*. EM Meyerowitz and CR Somerville eds. American Society of Plant Biologists. doi/10.1199/tab.0048. (<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>. [pdf])

Xu C., Wu X. 2009. Drought responses and related endogenous polyamine changes in mycorrhizaed *Pinus massoniana*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica.* 29(2):296-301.

Zia S., Khan A. 2002. Comparative effect of NaCl and seawater on seed germination of *Limonium stocksii*. *Pak. J. Bot.* 34(4): 345-350

Zia S., Khan A. 2004. Effect of light, salinity, and temperature on seed germination of *Limonium stocksii*. *Can. J. Bot.* 82: 151-157

ZhongQun H., ChaoXing H., ZhiBin Z., ZhiRong Z., HuaiSong W. 2007. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and surfaces B-biointerfaces.* 59 (2): 128-133

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Marjani Regvar za mentorstvo. Zahvaljujem se dr. Matevžu Likarju za vse strokovne nasvete in praktično pomočjo v času diplome ter za vsa ta leta, ko je bil vedno pripravljen pomagati.

Zahvaljujem se prijateljici Nini Vidmar, ki mi je bila vedno v oporo in mi dajala koristne nasvete v zvezi z diplomom.

Zahvaljujem se tudi družini, ki me je podpirala vsa ta leta.