

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Gregor PLESTENJAK

**ZALOGE GLOMALINA NA RASTIŠČIH Z
NARAVNO POVEČANO KONCENTRACIJO CO₂**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Gregor PLESTENJAK

**ZALOGE GLOMALINA NA RASTIŠČIH Z NARAVNO POVEČANO
KONCENTRACIJO CO₂**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GLOMALIN POOLS ON THE SITES WITH NATURAL CO₂
ENRICHMENT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na dveh različnih poskusnih poljih v Stavešincih (SZ Slovenija) in Bossoletu (Italija) in na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin, Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala izr. prof. dr. Dominika VODNIKA.

Komisija za oceno in zagovor.

Predsednik: prof. dr. Katja VADNAL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Dominik VODNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo

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

Datum zagovora:

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

Gregor PLESTENJAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- Dn Dn
DK UDK 631.466.12:631.433.53(043.2)
KG arbuskularno mikoruzne glive/glomalin/ naravni izviri CO₂/ tok CO₂ v tleh
KK AGRIS P34
AV PLESTENJAK, Gregor
SA VODNIK, Dominik (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2006
IN ZALOGHE GLOMALINA NA RASTIŠČIH Z NARAVNO POVEČANO KONCENTRACIJO CO₂
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 39, [1] str., 1 pregl., 30 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Številne raziskave zaplinjevalnih poskusov kažejo, da povečana koncentracija CO₂ vpliva na sekvestracijo ogljika v tleh. Pri tem ima zaradi svoje obstojnosti in vpliva na tvorbo talnih agregatov lahko pomembno vlogo talni glikoprotein glomalin. V naši raziskavi smo preučevali dve frakciji glomalina, lahko izločljivi glomalin in skupni glomalin, v tleh na rastiščih z naravno povečanimi koncentracijami CO₂, mofetah v Stavešincih (SV Slovenija) in Bossoletu (Italija). Vzorci tal so bili zbrani na mestih, kjer smo z aparatom za merjenje dihanja tal Li 6800 (Licor, ZDA) izmerili tok CO₂. V raziskavo so bila vključena mesta z majhnim, srednjim in velikim tokom CO₂ iz tal. Raziskava ni pokazala jasne povezave med talnim plinskim režimom in glomalinom. Frakcija lahko izločljivega glomalina se ni odzivala na povečano koncentracijo CO₂, kar kaže na to, da na sproti vnos glomalina v tla povečan CO₂ nima vpliva. V Bossoletu smo opazili povečane koncentracije glomalina pri večjem, ne pa tudi pri ekstremnem CO₂, kar lahko razložimo z zmanjšano razgradnjo glomalina pri spremenjenih plinskih razmerah. Takšnega povečanja pa nismo opazili na mofeti v Stavešincih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

Dn Dn
DC UDC 631.466.12:631.433.53(043.2)
CX arbuscular mycorrhizal fungi/glomalin/natural CO₂ springs/CO₂ efflux
CC AGRIS P34
AU PLESTENJAK, Gregor
AA VODNIK, Dominik (supervisor),
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2006
TI GLOMALIN POOLS ON THE SITES WITH NATURAL CO₂ ENRICHMENT
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 39, [1] p., 1 tab., 30 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Elevated atmospheric CO₂ concentrations can influence carbon sequestration in soils as revealed by several fumigation experiments. A soil glycoprotein glomalin could have an important function in this sequestration due to its high persistence and its effect on soil aggregation. In our study a content of two glomalin fractions, easily extractable and total, was measured in the soils from two sites with natural CO₂ enrichment, mofettes Stavešinci (NE Slovenia) and Bossoleto (Italy). Soil samples were taken on the sampling sites where soil CO₂ efflux had been determined by using soil respiration measuring system LI-6800 (Licor, USA). Sites with low-, medium- and high CO₂ fluxes were included into the study. Our research revealed that there is no clear relationship between soil gaseous regime and glomalin. Easily extractable fraction was non-responsive to elevated CO₂ which could indicate that recent deposition of glomalin into the soil is not affected by CO₂. We found increased concentration of total glomalin under elevated (but not extreme) CO₂ in Bossoleto, which could be explained by the lower decomposition of glomalin under changed gaseous conditions. This effect, however, cannot be found in Stavešinci mofette.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Okrajšave in simboli	X
	Slovarček manj znanih izrazov	XI
1	UVOD	1
1.2	IZHODIŠČA, NAMEN, HIPOTEZE	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ORGANSKA SNOV	3
2.1.1	Globalno kroženje ogljika	3
2.2	PROCES RAZKRAJANJA V TLEH	5
2.2.1	Sestava rastlinskih ostankov	5
2.2.2	Organske sestavine v rastlinskih ostankih	5
2.2.3	Primer organskega razkroja	6
2.3	HUMUS	7
2.3.1	Nehumusne substance	8
2.3.2	Humusne substance	8
2.3.3	Topljive skupine	9
2.4	MIKORIZA	9
2.4.1	Arbuskularna mikoriza (AM)	10
2.4.2	Glomalin	0
2.5	VPLIV POVEČANEGA CO ₂ NA VNOS OGLJIKA V ORGANSKO SNOV TAL	13
2.6	NARAVNI IZVIRI CO ₂	15
2.6.1	Učinki naravno povečane koncentracije CO₂ na rastline	16
3	MATERIAL IN METODE	18
3.1	OPIS LOKACIJ	18
3.2	METODA POSKUSA	20
3.3	MERJENJE PRETOKA CO ₂	21
3.4	VZORČENJE TAL	22
3.5	LABORATORIJSKO DELO	22
3.5.1	Ekstrakcija lahko izločljivega glomalina EEG	22
3.5.2	Ekstrakcija skupnega glomalina TG	22
3.5.3	Analiza proteinov (Bradfordov test)	22
3.5.4	Izračun količine glomalina	23
3.6	STATISTIČNE METODE	24
4	REZULTATI	25
4.1	TOK CO₂	25
4.2	VSEBNOST EEG IN TG	26

4.3	VSEBNOST GLOMALINA GLEDE NA TOK CO₂	26
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	30
5.1	RAZPRAVA	30
5.1.1	Tok CO₂ iz tal	30
5.1.2	Vsebnost glomalina v tleh z območja mofet	32
5.2	SKLEPI	34
6	POVZETEK	36
7	VIRI	37

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	Str
Preglednica 1: Predlog za novo nomenklaturu različnih frakcij talnega proteina in glomalina, kot jo predlaga Rillig (2004)	12

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Poenstavljen prikaz globalnega kroženja ogljika, s poudarkom na tistih zalogah ogljika, ki so najbolj povezane s količino ogljika v atmosferi. Vrednosti pri posameznih besedah predstavljajo petagrame ($P_g = 10^{15}/g$) ogljika shranjenega v največjih rezervoarjih. Vrednosti pri puščicah, pa predstavljajo količino ogljika, ki se letno pretaka po različnih poteh med rezervoarji (g/leto) (Earth observatory, 2006)	4
Slika 2: Razčlenitev organske snovi v tleh.	8
Slika 3: Na fotografiji je posušena in prečiščena oblika glomalina značilne temno rjave barve. Foto: D. Vodnik	11
Slika 4: Poskusno polje v Stavešincih. Na sliki je prikazan nepokošen del travnika na območju mofete, razbrati je moč zavrto rast v osrednjem delu te površine, za katero je odgovorna velika koncentracija CO ₂ (Vodnik in sod., 2006)	18
Slika 5: Fotografija poskusnega polja v Bossoletu.	19
Slika 6: Fotografija poskusnega polja v Stavešincih. Na fotografiji so označena mesta, kjer smo merili tok CO ₂ iz tal in vzorčili tla za analizo glomalina.	20
Slika 7: Shema tlorisa poskusnega polja v Bossoletu. Zemljišče je zaradi varnosti ograjeno z obzidjem. Tam kjer je puščica je vhod, ki je na znožju doline. Na sredini slike je najnižja točka doline. Tu je največ vrelcev CO ₂ , zato je rastje tu najbolj prizadeto, kar je vidno tudi s sheme. Mesta, označena s številkami, predstavljajo lokacije merjenja toka CO ₂	21
Slika 8: Prikaz povprečnega sezonskega toka CO ₂ za rastišče lokacije v Stavešincih. Meritve so potekale od julija do novembra 2005, vsaj enkrat ali dvakrat mesečno, skupno število meritev pa je bilo deset.	25
Slika 9: Prikaz pretoka CO ₂ skozi ovratnike v Bossoletu. Meritve so potekale maja 2005.	26
Slika 10: Vsebnost lahko izločljivega glomalina glede na tok CO ₂ iz tal Stavešinci.	27

Slika 11:	Vsebnost skupnega glomalina glede na tok CO ₂ iz tal, Stavešinci.	27
Slika 12:	Vsebnost lahko izločljivega glomalina pri vzorcih iz Bossoleta, glede na tok CO ₂ iz tal.	28
Slika 13:	Vsebnost skupnega glomalina v Bossoletu glede na tok CO ₂ iz tal.	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AM	arbuskularna mikoriza
BSA	bovine serum albumin – goveji serumski albumin
C₃ rastline	rastline s C ₃ fotosintezno presnovo
C₄ rastline	rastline s C ₄ fotosintezno presnovo
EEG	easily extractable glomalin – lahko izločljivi glomalin
FACE-poskusi	free air carbon dioxide enrichment poskusi - zaplinjevalni poskusi s povečano koncentracijo plina CO ₂ v odprtem prostoru
PBS	phosphate buffered saline – pufer PBS
pH	oznaka za kislost oz. bazičnost; merilo za koncentracijo hidronijevih/vodikovih ionov v raztopini
ppm	part per milion – milijonski del
RPM	obrati na minuto
TG	total glomalin – skupni glomalin, ki ga lahko izločimo iz tal
WUE	water use efficiency – učinkovitost izrabe vode

SLOVARČEK MANJ ZNANIH IZRAZOV

Anoksija – razmere brez kisika.

Arbuskul – fino razvejane hife, vidne v celicah koreninske skorje, kjer poteka izmenjava hranil in ogljikovih hidratov med arbuskularno mikorizno glivo in rastlino.

Avtoklaviranje – v osnovi sterilizacija z vročo paro v avtoklavu, običajno gre za segrevanje na 121°C, pri povečanem zračnem tlaku (1,1 bara).

Ekstrakcija – postopek izolacije določene snovi z raztapljanjem v topilu.

Ekstraradikalni micelij ali zunaj koreninski micelij – preplet glivnih HIV v substratu, ki izrašča iz korenin

Glomalin – glikoprotein, ki ga v tla odlagajo arbuskularne mikorizne glive.

Hifa – osnovni sestavni del steljke gljiv (micelija) zgrajene iz eno ali dvojedrnih celic s prečnimi septi ali iz mnogojedrne podaljšane nitke, ki sestavljajo micelij

Hipoksija – pomanjkanje kisika.

Intercelularne hife – hife mikoriznih gliv, ki so med celicami primarne skorje korenin

Intracelularne hife – hife gliv, ki so v celicah primarne skorje korenin.

Korteks – skorja.

Mofeta – naravni izvir plinskega ogljikovega dioksida.

Primarna skorja korenine – korteks, parenhimatsko tkivo na zunanem delu radialnega prereza korenine, navzven ga omejuje rizoderm (lahko tudi eksoderm), od centralnega cilindra ločen z endodermom.

Propaguli – spore ali hife gliv ali koščki koloniziranih korenin rastlin, v bistvu vsak del oz. ostanek gliv, oz. organizma, ki se je sposoben razviti v novo, samostojno enoto.

Simbioza – sožitje, medvrstni odnos v katerem imata oba partnerja korist, tudi mutualizem.

Spektrofotometrija – analitska tehnika, pri kateri lahko s pomočjo meritve absorpcije svetlobe določene valovne dolžine pri prehodu skozi vzorce ugotovimo koncentracijo določene snovi v vzorcu.

Spora – tros, razmnoževalna struktura pri glivah.

Vezikel – struktura arbuskularnih mikoriznih gliv z založno funkcijo.

1 UVOD

Globalno kroženje ogljika je proces, za katerega bi lahko rekli, da piše zgodbo življenja na našem planetu. Cikel zajema tla, kopenske vode in oceane, atmosfero, vse živali in rastline, druge organizme in tudi ljudi. Resne motnje cikla bi pomenile katastrofo za vse žive organizme na planetu. Ogljik je gradnik vsega živega, saj je sestavina vseh organskih spojin. Splošno znano je, da se koncentracija okoljskega oz. atmosferskega ogljikovega dioksida (CO₂) v svetovnem merilu povečuje. Na začetku 19. stoletja je koncentracija atmosferskega CO₂ znašala 290 ppm, danes pa je že dosegla 360 ppm in še vedno narašča, tako da predvidevajo, da naj bi do leta 2075 znašala že 700 ppm. Največja krivca za to sta industrija oz. promet, ki z rabo fosilnih goriv sproščata velike količine CO₂ v atmosfero. Velik del pri povečevanju koncentracije CO₂ v zraku ima tudi kmetijstvo, kjer zaradi spremenjene rabe tal prihaja do sproščanja velikih količin CO₂ zaradi hitrejšje mineralizacije humusa. Glavna posledica pri povečevanju globalne koncentracije atmosferskega CO₂ je segrevanje ozračja ali tako imenovani učinek tople grede. Povečana temperatura močno vpliva na rastlinstvo.

Zaloga ogljika v svetovni rastlinski biomasi je velika, vendar kar trikrat manjša od zaloge ogljika v tleh. Zavedati se moramo, da vse kar je živo sčasoma konča svojo pot v tleh, kjer se začnejo procesi razgradnje in mineralizacije. Hitrost razkroja je odvisna od fizikalno kemičnih dejavnikov v tleh in mikrobiološke aktivnosti v tleh. Organska snov v tleh vsebuje približno trikrat toliko ogljika kot vse rastlinstvo in pomembno prispeva k ohranjanju globalnega ravnotežja ogljika. Rastline vnašajo ogljik v tla z odpadom oz. odmrlo rastlinsko biomaso, pa tudi neposredno s t.i. rizodepozicijo. Pomembno vlogo pri vključevanju ogljika v tla imajo tudi glive, posebej mikorizne, ki predstavljajo vezni člen pri prenosu C iz fotosintezno aktivne rastline v tla. Ena pomembnejših C-spojin, ki sodelujejo pri tem vnosu naj bi bil hidrofoben glikoprotein imenovan glomalin, ki ga tvorijo arbuskularne mikorizne glive. Glomalin lahko predstavlja v tleh tudi do 27 % talnega ogljika in velik delež organske snovi v tleh. Tudi zaradi njegove velike obstojnosti, njegov razkroj poteka zelo počasi (7–42 let), in pomembne vloge pri stabilizaciji strukturnih agregatov, predstavlja pomemben dejavnik pri kopičenju ogljika v tleh. Proces vključevanja glomalina v tla je proces, ki ga je potrebno za različne okoljske razmere bolj raziskati, saj bi lahko vnos ogljika v tako obstojno substanco kot je glomalin vplival celo na dinamiko naraščanja globalne koncentracije CO₂.

1.2 IZHODIŠČA, NAMEN, HIPOTEZE

Pri proučevanju vpliva povečanih koncentracij CO₂ na organizme se poleg zaplinjevalnih poskusov lahko poslužimo tudi raziskav na naravnih izviri CO₂. Naravni izviri CO₂ ali mofete nastanejo na mestih, ki so bila v preteklosti ali sedanjosti vulkansko aktivna. Tu so vrednosti talnih in atmosferskih koncentracij CO₂ mnogo večje od tistih na normalnih rastiščih, zato so mofete primerne za preučevanje dolgotrajnih učinkov povečane koncentracije CO₂. V preteklosti so bile na takšnih rastiščih

opravljene številne raziskave, ki pa niso vključevale proučevanj odziva mikorize na spremenjene plinske razmere.

Namen naše diplomske naloge je bil preučiti ali lahko povečano koncentracijo CO₂ v tleh povežemo s količino glomalina, ki naj bi ga v tla sprostile arbuskularne mikorizne glive.

Ker je znano, da ekstremno povečane koncentracije CO₂ negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin, je moč pričakovati, da bo v takšnih razmerah zmanjšana proizvodnja glomalina. Na to bi lahko sklepali na podlagi meritev lahko izločljivega glomalina (EEG).

Ker pričakujemo, da na mestih povečane koncentracije talnega CO₂ razgradnja glomalina poteka počasneje zaradi zaviralnega učinka povečanega CO₂ na mikrobiološko aktivnost v tleh predvidevamo, da se bo kopičenje glomalina odražalo na povečani količini skupnega glomalina (TG).

2 PREGLED OBJAV

2.1 ORGANSKA SNOV

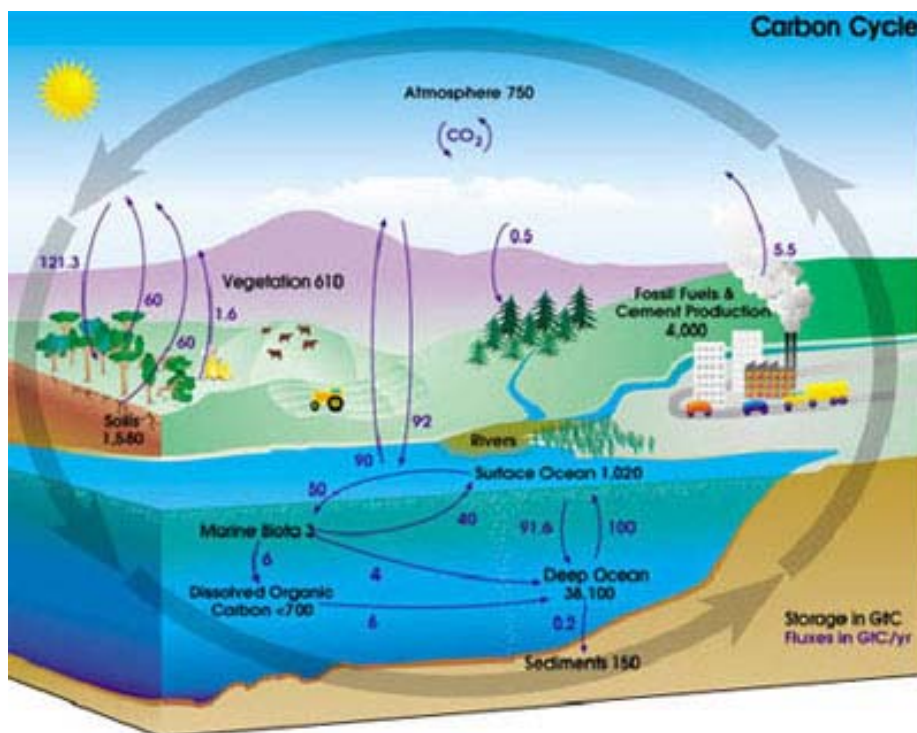
Vse organske snovi vsebujejo ogljik. Organska snov v tleh vsebuje približno trikrat toliko ogljika kot vse rastlinstvo in pomembno prispeva pri ohranjanju globalnega ravnotežja ogljika. Čeprav organska snov v tleh predstavlja le manjši delež v masi večine tal, pa ta dinamična komponenta močno vpliva na fizikalne, kemične in biološke lastnosti tal.

Organska snov v tleh je kompleksna in pisana mešanica organskih spojin. Ima veliko sposobnost zadrževanja vode in dobro kationsko izmenjalno kapaciteto. Določene snovi v organski snovi tal so v veliki meri odgovorne za nastanek strukturnih agregatov v tleh. Organska snov v tleh deluje kot založno skladišče, saj vsebuje velike količine rastlinskih hranil, predvsem dušika. Poleg tega pa organska snov zagotavlja energijo in strukturne snovi za rast večine mikroorganizmov, ki v tleh mineralizirajo organsko snov do osnovnih rastlinskih hranil, kot so nitrat, fosfat, sulfat. Zaradi vseh teh dejavnikov je količina in kvaliteta organske snovi v tleh osrednji faktor pri določevanju kvalitete tal (Brady in Weil, 2002).

Pri opisovanju organske snovi v tleh se bomo najprej posvetili njeni vlogi v globalnem kroženju ogljika, nadaljevali pa bomo z opisom procesa razgradnje organske snovi v tleh in sestavo ter značilnosti njenih ostankov v tleh.

2.1.1 Globalno kroženje ogljika

Ogljik je eden od elementov, ki so v organizmih zastopani v velikem deležu. Sestavini živih tkiv, kot sta celuloza in klorofil, sta zgrajeni iz ogljikovih atomov na katere so vezani drugi elementi. Globalno kroženje ogljika piše zgodbo življenja na našem planetu, saj zajema tla, vse višje rastline, živali, vključno z ljudmi. Resne motnje cikla bi pomenila katastrofo za vse žive organizme na planetu (Brady in Weil, 2002).



Slika 1 Poenostavljen prikaz globalnega kroženja ogljika, s poudarkom na tistih zalogah ogljika, ki so najbolj povezane s količino ogljika v atmosferi. Vrednosti pri posameznih besedah predstavljajo petagrame ($\text{Pg} = 10^{15}/\text{g}$) ogljika shranjenega v največjih rezervoarjih. Vrednosti pri puščicah pa predstavljajo količino ogljika, ki se letno pretaka po različnih poteh med rezervoarji (Pg/leto) (Earth observatory, 2006)

Rastline imajo sposobnost absorbirati zračni CO₂, iz katerega v procesu fotosinteze, s pomočjo energije sončne svetlobe tvorijo enostavne sladkorje in kasneje kompleksnejše organske molekule, kot so škrob, sladkor, celuloza, hemiceluloza,... Nekateri od teh npr. škrob, sladkor lahko rastlina uporabi kot lasten vir energije, kjer se ogljik vrne v atmosfero kot CO₂. Organske molekule, kot sta celuloza in hemiceluloza, pa se vgradijo v vegetativne dele rastline in so sčasoma dodane tlam kot odpadlo listje in drugih delov rastline (žetveni ostanki). Pomembno vlogo pri vnosu ogljika v tla imajo tudi korenine, kjer se z ekzodacijo korenin v tla izločajo različne ogljikove spojine. Nekateri deli rastline lahko služijo kot hrana za živali in ljudi. Pri tem se polovica zaužitega ogljika vrne v atmosfero z izdihanim CO₂, polovica pa ga konča v tleh z iztrebki in odmrli ostanki. Vsi rastlinski in živalski ostanki dodani tlam služijo kot vir energije talnim organizmom, ki sčasoma povrnejo ogljik v atmosfero kot CO₂ (Brady in Weil, 2002).

Manjše količine CO₂ lahko reagirajo s tlemi in producirajo ogljikovo kislino in karbonate ter bikarbonate povezane s kalcijevimi, kalijevimi, magnezijevimi ali kakimi drugimi bazičnimi kationi. Bikarbonati so dobro topni, zato se lahko iz tal odstranijo z odcedno vodo. Sčasoma se večina ogljika v karbonatih in bikarbonatih vrne v atmosfero kot CO₂ (Brady in Weil, 2002).

Nekateri produkti mikrobnega metabolizma v tleh so tako stabilni, da lahko mine tudi več desetletij ali stoletij, preden se ogljik, vezan v teh snoveh, lahko povrne v atmosfero kot CO₂. Takšna zmožnost upiranja razgradnji omogoča kopičenje organske snovi v tleh (Brady in Weil, 2002).

2.2 PROCES RAZGRADNJE V TLEH

Zato, ker rastlinski ostanki predstavljajo glavni material, ki je podvržen razgradnji v tleh in posledično primarni vir organske snovi v tleh, začnemo proces razgradnje v tleh razlagati z njihovo sestavo.

2.2.1 Sestava rastlinskih ostankov

Voda predstavlja 60 do 90 % mase v zelenih tkivih rastlin. Če ta tkiva presušimo in odstranimo vso vodo, analiza sušine pokaže, da le-ta v glavnem sestoji iz ogljika, kisika in vodika.

Rastlina te elemente pridobi med procesom fotosinteze iz CO₂ in vode. Pri sežigu (oksidaciji) rastlinske sušine iz teh elementov ponovno nastanejo CO₂ in voda. Seveda nastaja tudi pepel in dim, ki predstavlja od 5 do 10 % preostale suhe mase. V dimu in pepelu lahko najdemo veliko hranljivih elementov, katere je rastlina pridobila iz tal. Čeprav so ti elementi prisotni v relativno manjših količinah, imajo pomembno vlogo pri prehrani rastlin in živali in pri usklajevanju zahtev mikroorganizmov (Brady in Weil, 2002).

2.2.2 Organske sestavine v rastlinskih ostankih

Tkiva različnih rastlinskih vrst, kot tudi različnih delov rastline (listi, korenine, stebela,...) se močno razlikujejo po svoji sestavi. Ogljikovodiki so ponavadi najbolj pogosta in obilna organska sestavina rastlin, ki si po svoji kompleksnosti sledijo od najenostavnejših sladkorjev in škroba do celuloze.

Lignini so komponente rastlinskih celičnih sten in sestojijo iz mnogih ponovljivih kompleksnih obročastih fenolnih struktur. Vsebnost lignina se v rastlini povečuje s staranjem in ga je še posebej veliko v olesenelih tkivih. Drugi polifenoli, kot so tanini, lahko sestavljajo 6 do 7 % listja ali lubja nekaterih rastlin. Lignini kot tudi drugi polifenoli, so vsesplošno znani po svoji odpornosti na razgradnjo. Določeni rastlinski deli, še posebej semenska in listna povrhnjica vsebujejo pomembne količine voskov, ki so kompleksnejši po sestavi od ogljikovih hidratov in manj od ligninov (Brady in Weil, 2002).

Proteini vsebujejo okoli 16 % dušika in manjše količine drugih esencialnih elementov, kot so žveplo, magnezij, baker in železo. Enostavni proteini so lahko razgradljivi in hitro

sprostijo dušik, medtem ko so kompleksnejši proteini bolj odporni na razgradnjo (Brady in Weil, 2002).

Organske sestavine se razlikujejo po hitrosti razgradnje in si sledijo od najhitreje razgrajajočih substanc do najpočasneje razgrajajočih:

- sladkorji, škrob, enostavnejši proteini,
- kompleksnejši proteini,
- hemiceluloza,
- celuloza,
- maščobe, voski in podobne snovi,
- lignini in druge fenolne spojine.

Čas, potreben za dokončno razgradnjo in mineralizacijo, je lahko dolg od nekaj dni do nekaj let, odvisno od dveh glavnih dejavnikov: (1) fizikalno-kemijskih razmer v tleh in (2) kako dober vir hrane predstavljajo v tla sproščeni ostanki za talne organizme.

Najpomembnejši talni dejavniki v tleh so pH, ki mora biti blizu nevtralnemu, primerna sestava tal, dobra zračnost tal (60 % por v tleh zasičenih z vodo) ter primerno visoka temperatura (25 do 30° C). Take razmere omogočajo dobro delovanje mikroorganizmov v tleh. Poleg tega pa so za uspešno presnovo talnih mikroorganizmov pomembni tudi drugi dejavniki, kot so: kvaliteta ostankov, ki jih mikroorganizmi porabijo kot vir hrane, razmerje med dušikom in ogljikom (C/N razmerje) in vsebnost ligninov in polifenolov v organskih ostankih (Brady in Weil, 2002).

2.2.3 Primer organske razgradnje

Predstavljajmo si tla, katerim že dolgo niso bili dodani ali prinešeni rastlinski ostanki. Osnovno mikrobno metabolno delovanje v takih tleh predstavljajo avtohtoni organizmi, ki preživijo s počasnim presnavljanjem zelo odporne in stabilne organske snovi v tleh. Tekma za hrano je huda in mikrobna aktivnost je majhna, na kar kaže tudi majhna količina proizvedenega CO₂ v tleh. Založenost tal z ogljikom počasi upada.

Jeseni, ko odpade listje, ali ko na njivi ostanejo žetveni ostanki, naenkrat nastane obilje svežih in razgradljivih tkiv v tleh. Pojav lahko razgradljivih in pogosto vodotopnih sestavin, kot so npr. sladkorji, škrob in amino kisline stimulira skoraj takojšnjo povečanje metabolne aktivnosti talnih organizmov. V kratkem počasi delujoče avtohtone populacije zamenjajo hitro reprodukcijske populacije oportunističnih organizmov, ki so se zbudili iz svoje dormance ob prisotnosti novih zalog hrane. Oportunističnim organizmom se hitro pridružijo tudi organizmi, ki prebavljajo celulozo. Kot odgovor na nov vir hrane v tleh se eksponentno poveča število mikrobov v tleh in količina sproščenega CO₂ zaradi mikrobnega dihanja (Brady in Weil, 2002).

Kmalu je mikrobna aktivnost na vrhu in tvorijo se velike količine CO₂. Pri množenju in povečevanju biomase mikrobi sintetizirajo nove organske sestavine. Močna mikrobna

aktivnost lahko tudi stimulira razčlemba nekaterih odpornih sestavin organske snovi v tleh, t.i. vžigalni efekt.

Hitro razgradljive sestavine so pri vsej tej obilni mikrobnosti hitro porabljene. Medtem ko večina razkrojevalcev celuloze in lignina nadaljuje svoje počasno delo, oportunistični mikroorganizmi začno odmirati zaradi stradanja. Mrtve celice hitro odmirajoče populacije mikrobov predstavljajo dodaten vir prebavljive hrane za preživle mikroorganizme, ki nadaljujejo z oddajanjem CO₂ in vode. Razgradnja mrtvih mikrobnih celic je tudi povezana z mineralizacijo ali sproščanjem enostavnih anorganskih produktov, kot so npr. nitrati in sulfati.

Pri nadaljnjem reduciranju zaloge hrane pada mikrobnost in oportunistični mikroorganizmi so prisiljeni v pogojeno mirovanje. Ohranjenih ostane le malo od začetne količine ostankov, večinoma kot drobni delci, ki so bili fizično zaščiteni pred razkrojem, s tem da so premočno vezani v talne pore, da bi bili dostopni mikroorganizmom. Nekaj preostalega ogljika se je kemično ohranilo s pretvorbo v talni humus, to je temno obarvana, heterogena, večinoma koloidna mešanica modificiranega lignina in na novo sintetizirane organske snovi, ki se močno upira nadaljnji razgradnji. Delež finega humusa je nadaljnjo zaščitenega z močno vezavo na talne delce. Na ta način se majhen delež ogljika, dodanega z ostanki, ohrani in povečuje količino stabilne organske substance v tleh (Brady in Weil, 2002).

2.3 HUMUS

Termin organska substanca tal vključuje:

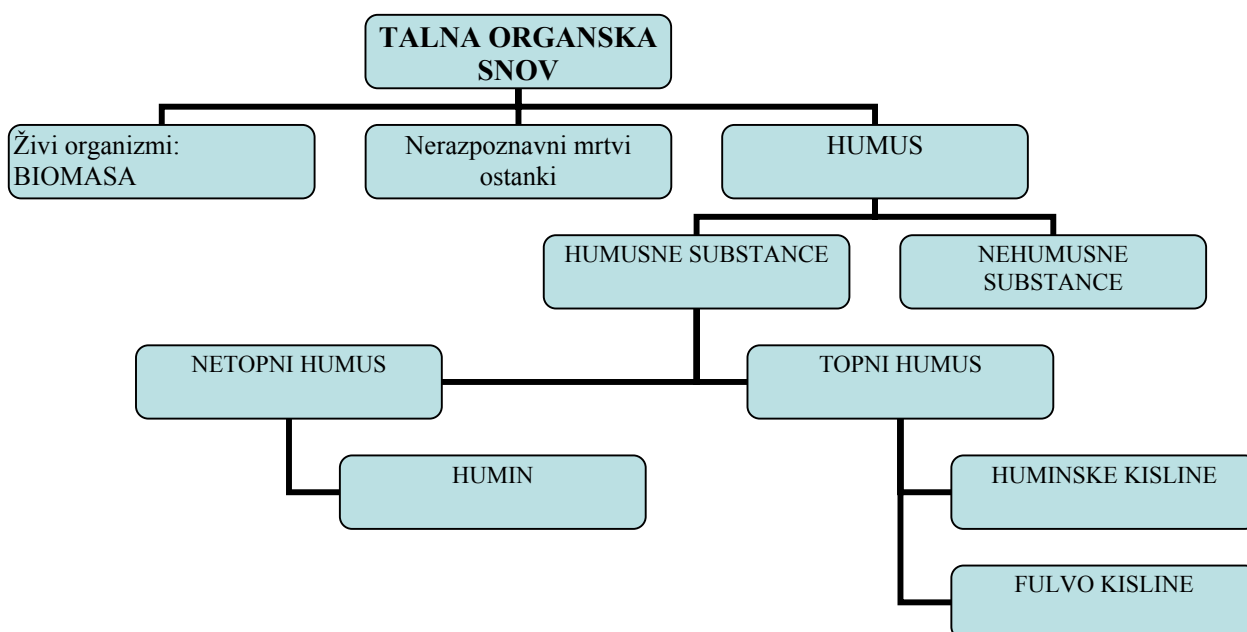
- živa biomasa (rastline, živali, mikroorganizmi),
- mrtvi koreninski ostanki in drugi prepoznavni rastlinski ostanki,
- amorfna in koloidna mešanica, ki je ne moremo prepoznati kot tkiva.

Pri tem lahko tretjo kategorijo označimo kot talni humus.

Pri razkrajanju rastlinskih ostankov mikrobi spreminjajo kompleksne sestavine v enostavnejše. Eden izmed takih procesov je na primer razčlenitev lignina na fenolne podenote. Tako nastale enostavnejše snovi talni mikroorganizmi uporabijo za lasten metabolizem, tako da z dušikom, žveplom in kisikom vsebovanim v teh molekulah sintetizirajo nove celične komponente in biomolekule. Nekaj prvotnega lignina ni v celoti razčlenjenega, ampak se spremeni v kompleksni molekularni ostanek, ki ohranja značilnosti lignina. Mikrobi medsebojno povežejo na novo nastale enostavnejše snovi z ligninskim ostankom in na ta način tvorijo kompleksne verige, ki so bolj odporne na nadaljnje razkrojevanje. Novo nastale verige, z veliko molekularno maso, nato delujejo z dušikom vsebujočimi spojinami in imajo pomembno vlogo pri nastanku obstojnega humusa. Prisotnost koloidnih delcev (gline) spodbudi polimerizacijo. Te nerazločne, kompleksne, odporne polimerne zmesi imenujemo humusne substance. Izraz nehumusne substance pa se nanaša na skupino biomolekul, ki se lahko istovetijo z biomolekulami,

ki jih producirajo mikrobi in so v osnovi manj odporne na razkroj (Brady in Weil, 2002).

Po enem letu, ko so bili v tla dani rastlinski ostanki, se večina ogljika vrne v atmosfero kot CO₂, vendar ga petina do tretjina verjetno ostane v tleh kot živa biomasa (5 %), kot humusne substance (20 %) ali kot nehumusna frakcija (5 %) talnega humusa. (Koreninski ostanki so nekoliko večji od ostankov odpadnega listja) (Brady in Weil, 2002).



Slika 2: Razčlenitev organske snovi v tleh (Brady in Weil, 2002)

2.3.1 Nehumusne substance

Približno 20 do 30 % humusa v tleh sestoji iz nehumusnih substanc. Te substance so manj kompleksne in bolj dovzetne za mikrobni razkroj kot humusne. Za razliko od humusnih se nehumusne substance sestojijo iz specifičnih biomolekul z različnimi fizikalnimi in kemičnimi značilnostmi. Lahko so mikrobno spremenjene rastlinske snovi ali na novo sintetizirane snovi, ki ji ustvarijo talni mikrobi kot stranski produkt pri razkrajanju (Brady in Weil, 2002).

2.3.2 Humusne substance

Humusne substance vključujejo 60 do 80 % organske snovi tal. Sestavljene so iz velikih spremenljivih molekul, s specifičnimi strukturami in kompozicijo. Značilnost humusnih substanc je, da sestojijo iz aromatičnih (obročastih) struktur, ki vsebujejo polifenole (medsebojno povezane številne fenolne enote) in polikinine, katerih struktura je še bolj

zapletena. Humusne substance so običajno temno obarvane, amorfne in z molekulskimi masami od 2000 do 300000 g mol⁻¹. Zaradi svoje zapletenosti so tisti del organske snovi, ki je najbolj odporen na razkrajanje mikrobov.

2.3.3 Topljive skupine

Humusne substance razdelimo v tri kemične skupine glede na topnost:

1. Fulvo kisline: imajo najmanjšo molsko maso, najsvetlejšo barvo, so topne tako v alkalnem, kot v kislem pH in so najbolj dovzetne za napad mikrobov.
2. Huminske kisline: srednje v molekulski masi in srednje temne barve, topne v alkalnem in netopne v kislem, srednje dovzetne za napad mikrobov.
3. Humin: največje molekulske mase, najbolj temna barva, netopen tako v alkalnem, kot tudi kislem mediju, so najbolj odporne na mikrobni razkroj.

Vse tri skupine humusnih substanc so relativno trajne v tleh. Tudi fulvo kisline, ki so najbolj dovzetne za razkroj, so bolj odporne na napad mikrobov kot sveže dodani rastlinski ostanki. Polovični razkrojni čas pri fulvo kislinah (čas, ki je potreben, da se razkroji polovica te snovi v tleh) je odvisen od okolja in znaša 10 do 15 let, medtem ko je pri huminski kislini ta čas na splošno merjen v stoletjih (Brady in Weil, 2002).

Velik del humusne substance v tleh predstavlja tudi snov poimenovana glomalin, ki naj bi bil predvsem produkt arbuskularne mikorize in je pomembna za organsko snov v tleh (Wright in Upadhyaya, 1996). Podrobnejšo in postopnejšo obrazložitev glomalina podajamo v nadaljevanju.

2.4 MIKORIZA

Mikoriza je pojem, ki označuje sožitje med višjimi rastlinami in med glivami. Ta simbioza je poznana v skoraj vseh habitatih in se razvija že od prihoda rastlin na kopno pred približno 400 milijoni let. Znanih je več tipov mikorize: ektotrofna mikoriza, pri kateri se gliva nahaja zunaj celice in endotrofna mikoriza (tipi: arbuskularna (AM), erikoidna in orhidejska), kjer gliva vstopa med in v celice korenin. Pri tem ne prodira v centralni cilinder in meristem korenine, temveč naseli le celice v njenem korteksu (koreninski primarni skorji). Hife gliv pri endotrofni mikorizi naseljujejo po večini le najmlajše in najtanjše koreninice. V substratu se razraščajo dlje kot rastlinske korenine, večjajo absorpcijsko območje v rizosferi (v kubičnem centimetru tal je lahko tudi do več deset metrov hif mikoriznih gliv) in transportirajo fosfor, ki je rastlinam zaradi slabe difuzije in vezave v netopne oblike dostopen v omejenih količinah. Pomagajo tudi pri sprejemu drugih mineralnih hranil ter vode v rastlino. Ta posreduje glivi ogljikove hidrate, ki predstavljajo glivi edini energetski vir organskega ogljika. AM glive tudi varujejo rastlino pred patogenimi organizmi. Prav tako varujejo rastline pred negativnimi vplivi težkih kovin. V zadnjem času se, zaradi potencialne biotehniške

uporabnosti, skuša pridobiti čim več različnih vrst in sevov arbuskularnih mikoriznih gliv (Maček, 2004; Smith in Read, 1997).

2.4.1 Arbuskularna mikoriza (AM)

Arbuskularna mikoriza je prisotna pri nekaterih predstavnikih praproti, lisičjakovcev in mahov ter velikem številu družin golosemenk in kritosemenk. Najdemo jo na 80 % vseh rastlinskih vrst (Smith in Read, 1997).

AM glive so neseptirane nižje glive, obligatni (obvezni) simbionti in nimajo saprofitskih sposobnosti, zato jih ne moremo gojiti brez gostiteljskih rastlin. Razvijale so se sočasno s svojimi gostitelji, to je že od prihoda rastlin na kopno. Uvrščajo jih v več rodov: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* in *Entrophospora* in v red *Endogonales* (Smith in Read, 1997).

Razvoj AM je odvisen od rastlinske vrste, AM gliv in od tipa tal. Kolonizacija AMG poteka v več stopnjah: (1) prekolonizacija, (2) primarna kolonizacija, (3) razvoj in obstojnost arbuskulov, (4) razširjanje kolonizacije znotraj korenin in v rizosferi, (5) sekundarna kolonizacija in (6) rast gliv v tleh. Kalitev spor, rast in razraščanje hif AM gliv stimulirajo izločki gostiteljskih rastlin (1). Hife tvorijo na površini korenine apresorije, preko katerih začno mehansko (delno tudi s hidrolitičnimi encimi) prodirati v epidermalne celice (epidermis) korenin (2). Od tam se širijo na vse strani in tvorijo t. i. infekcijsko enoto. Hife najdemo v koreninah med celicami (intercelularne hife) in v njih (intracelularne hife). V celicah se razraščajo in tvorijo značilno razvejane haustorije – arbuskule (3). Gostiteljeva celična membrana (periarbuskularna membrana) arbuskul popolnoma obda in tu nastane stična površina, kjer prihaja do izmenjave snovi med simbiontoma. Rastlina posreduje sladkorje, gliva pa v zameno daje minerale in vodo. Življenjska doba arbuskulov je le 4 do 15 dni. Še zdaj ni razjasnjeno ali je propadanje arbuskulov avtolitično ali pa gre za litične procese gostitelja. (4, 5) V primarni skorji (korenine) tvori hifa še eno strukturo, značilno za AM glive, to je vezikel. Vezikli so terminalne in interkalarnе odebelitve hif glive, vsebujejo veliko lipidov, zato imajo založno funkcijo. (5) Ko AM gliva prodre v korenino, se začne rast zunaj koreninskega (ekstraradikalnega) glivnega micelija. Ta tvori spore, s katerimi se gliva razmnožuje in se diferencira tudi v različne hife (absorpcijske hife, povezovalne hife). Spore so edini deli gliv, s pomočjo katerih lahko določimo posamezne vrste. Hife ene glive lahko tudi povezujejo več rastlin. Gliva se lahko poleg spor razmnožuje tudi s hifami v substratu ali s strukturami na koloniziranih delih korenin (Smith in Read, 1997).

2.4.2 Glomalin

Glomalin je snov, ki jo izločajo AM glive iz rodov *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Entrophospora* in *Glomus*. Prav po slednjem je dobil ime glomalin. Odkrili so ga šele leta 1996, kot nepoznano organsko lepilo, ki se prilepi na minerale in organske snovi v tleh ter tako poveča stabilnost agregatov (Wright in Upadhyaya, 1996). Že v začetnih raziskavah so dokazali, da različne vrste AM gliv proizvajajo različne

količine glomalina, vendar ne vedo kdaj, kako in zakaj. Prav tako še ne vedo v kakšnih razmerah sta njegova sinteza in odlaganje največja in kako je z njegovo razgradnjo. Je hidrofoben glikoprotein, zgrajen iz proteinske in ogljikohidratne podenote (sladkor), ki vsebujeta od 30 do 40 % ogljika. Nase ima lahko močno vezane ione železa (9 % mase proteina) in druge ione (Maček in Vodnik, 2005).



Slika 3: Na fotografiji je posušena in prečiščena oblika glomalina značilne temno rjave barve. Foto: D. Vodnik.

Ocenjujejo, da glomalin predstavlja 27 % talnega ogljika in velik delež organske snovi v tleh. Glomalin je v tleh zelo obstojen (7–42 let), odvisno od okoljskih razmer, zato je njegova koncentracija dober pokazatelj prisotnosti AM gliv v tleh v daljšem obdobju (Maček in Vodnik, 2005).

Glomalin se najprej nahaja na zunanji površini hif, ko le-te odmrejo pa se prilepi na talne agregate. Protein naj bi varoval hife pred mehanskimi poškodbami, pred izgubo načrpanih hranil, izsušitvijo in predatorji. Prav tako naj bi pomagal pri prodiranju hif skozi trdne delce, dajal naj bi jim potrebno togost pri premoščanju praznih zračnih prostorov in jih kot lepilo pritrjeval na talne delce (Maček in Vodnik, 2005).

Pozitivno deluje tudi na rastline, saj ustvarja primerno okolje za njihovo rast, zleplja talne agregate v večje skupke, jih stabilizira, kar posledično vodi do boljše strukture in manjše vetrne in vodne erozije tal ter do boljšega pridelka (Maček in Vodnik, 2005; Maček, 2004).

Ločimo tri frakcije glomalina: (1) lahko izločljivi glomalin, ki se izloči po prvem ekstrakcijskem ciklu, (2) skupni glomalin, ki ga lahko z ekstrakcijskimi postopki (več ponavljajočih se ciklov) izločimo iz tal (Wright in Upadhyaya, 1998) in (3) rezidualni

glomalin, ki ga z doslej poznanimi postopki še ne moremo ekstrahirati iz tal (Lovelock in sod., 2004; Nichols in sod., 2003, cit. po Maček, 2004).

Z analizami glomalina lahko posredno ocenimo koloniziranost z AM glivami, vendar ima ta pristop, tako kot ocena s pomočjo analize drugih dveh za glive značilnih spojin t.j. ergosteola in hitina, svoje pomanjkljivosti. Trenutno znanje o glomalinu in razpoložljive ekstrakcijske in analitske tehnike so še vedno nepopolne, zaradi česar je neposredna povezava z obsegom AM problematična (Rosier in sod. 2006). Pri dosedajšnji domnevi je veljalo, da naj bi bili z uporabo Bradfordove metode pri procesu ekstrakcije uničeni vsi ali pa vsaj večina proteinov, razen glomalina. Vendar temu ni tako. Najnovejše raziskave kažejo, da se pri procesu ekstrakcije ne denaturirajo vsi proteini rastlinskega izvora. Ti proteini so zadostne velikosti in so zastopani v zadostni količini, da jih lahko zaznamo z Bradfordovo metodo. Obstaja nekaj splošno znanih razredov proteinov rastlinskega izvora, ki bi lahko prenesli avtoklaviranje. Na ta način organska snov vpliva na Bradfordovo metodo, ki ne predstavlja več metode za točno ocenitev količine glomalina v tleh. Po teh dognanjih je Bradfordova metoda uporabna le za tla, ki imajo zelo majhno koncentracijo organske snovi, kot so npr. močno sprana tla ali že avtoklavirana tla. Čeprav navajajo, da naj bi bila že poznana sekvenca gena za tvorbo glomalina v AM glivah, analitske tehnike, ki so trenutno v uporabi, niso zadosti specifične (Rillig, 2004; Rosier in sod., 2006). Zaradi tega so predlagali novo nomenklaturu za proteinske frakcije, ki jih z omenjeno metodo kvantificiramo (Preglednica 1).

Najnovejša dognanja raziskav, kjer skušajo določiti sekvenco gena za tvorbo glomalina kažejo podobnost v aminokislinskem zaporedju med glomalinom in heat shock proteinom (hsp 60). Do teh dognanj so prišli tako, da so uspeli s tekočinsko kromatografijo odkodirati zaporedje DNA pri AM glivi *Glomus intraradices*, ki je velikosti 1773 baznih parov. Znotraj DNA so odkrili gen, ki je zelo podoben tistemu za tvorbo heat shock proteina. Ta gen naj bi skrbel za tvorbo proteina, ki je sestavljen iz 590 amino kislin. Izoliran protein so nato testirali na testu ELISA z za glomalin specifičnim antitelesom Mab32B11. Rezultati so pokazali, da je protein podobno reagiral s protitelesom kot glomalin, kar kaže na njuno podobnost (Gadkar in Rillig, 2006).

Sara Wright in sodelavci so v zadnjem času preučevali do kakšnih razlik lahko prihaja pri Bradfordovi metodi z uporabo različnih ekstrakcijskih sredstev. Med seboj so primerjali tri ekstrakcijska sredstva, in sicer najbolj uporabljeni citrat, borat in pirofosfat in preučevali pri katerem je moč po opravljenem avtoklaviranju izmeriti več glomalinu podobnega proteina. Rezultati raziskave kažejo, da s citratom dobimo najmanjšo vrednost glomalina, s pirofosfatom pa največjo (Wright in sod., 2006).

Preglednica 1: Predlog za novo nomenklaturu različnih frakcij talnega proteina in glomalina, kot jo predlaga Rillig (2004).

Staro poimenovanje	Novo poimenovanje	Razlog za spremembo
TG (total glomalin)	BRSP (Bradford reactive soil protein)	Pri Bradfordovi metodi izmerimo ves protein v vzorcu (ni specifična)
EEG (easily extractable glomalin)	EE-BRSP (Easily extractable BRSP)	Pri Bradfordovi metodi izmerimo ves protein v vzorcu (ni specifična)
IRTG (immunoreactive total glomalin)	IRSP (immunoreactive Mab32B11 soil protein)	Možnost za različne vezave protiteles
IREEG (immunoreactive easily extractable glomalin)	EE-IRSP (Easily extractable Mab32B11 soil protein)	Možnost za različne vezave protiteles
Glomalin (izraz uporabljen za ves glomalin, izmerjen po Bradfordu in z ELISA testom)	GRSP (Glomalin related soil protein)	Da bi jasno ločili protein, ki se nahaja v tleh, od tistega, ki ga domnevno producirajo geni
Glomalin (še ne identificiran glomalin)	Glomalin(i)	Ime je rezervirano za glomalin, protein

V svoji diplomski nalogi sem, upoštevajoč novo terminologijo, določal vsebnost z glomalinom povezanega proteina v tleh (GRSP) (Rillig, 2004), pri čemer sem uporabil Bradfordov test (glej metode!). Šlo je torej za analizo BRSP (Bradford reactive soil protein). Zaradi enostavnejšega podajanja dejstev pa v nalogi še vedno uporabljam izraz glomalin, ki naj bi bil sicer rezerviran za protein, genski produkt.

2.5 VPLIV POVEČANEGA CO₂ NA VNOS OGLJIKA V ORGANSKO SNOV TAL

Po nekaterih ocenah naj bi se koncentracija atmosferskega CO₂ do leta 2075 podvojila iz sedanjih 360 ppm na približno 700 ppm (Godbold in sod., 2006). Dinamika povečevanja koncentracije atmosferskega CO₂ bo odvisna tudi od vnosa in zadrževanja ogljika v rastlinski biomasi in v organski snovi tal (Pfanzer in sod., 2004).

V ta namen so bili in se še izvajajo mnogi poskusi, kjer na rastiščih z raznovrstnimi vegetacijami izpostavljenim navadnim okoljskim koncentracijam atmosferskega CO₂ (380 ppm) in povišanim koncentracijam atmosferskega CO₂ (580 ppm) preučujejo vključevanje ogljika v talno organsko snov. V teh poskusih se okolje s povečano koncentracijo atmosferskega CO₂ vzpostavlja z zaplinjevalnim sistemom FACE (Free Air Carbon dioxide Enrichment). FACE sistem deluje tako, da preko velikega števila

cevčic v atmosfero pri velikih hitrostih vbrizgava čisti CO₂ v količinah, ki v končni fazi pomenijo na preučevani površini želeno koncentracijo. Ta sistem je zelo uporaben, saj omogoča večletno spremljanje učinkov CO₂ in tudi oceno kopičenja ogljika v tleh (Godbold in sod., 2006).

Proces vključevanja C v organsko snov tal je zelo kompleksen pojav, zato se ga preučuje in ocenjuje na večih ravneh, in sicer preko vnosa z razkrojem odpadlega listja, finih korenin in mikoriznega delovanja. Poleg tega pa se tudi opazuje, kako povečan CO₂ vpliva na C:N razmerje v tleh, mikrobno biomaso in na vodni režim v tleh. V nadaljevanju so opisana dognanja iz večih FACE poskusov.

Pri dolgotrajnih študijah, izvedenih na travišču trpežne ljujke, opremljenih z zaplinjevalnimi sistemi FACE, je bila opažena izrazita stimulacija listne fotosinteze zaradi povečanega CO₂. Stimulacija je bila največja v času košnje, v najtopplejšem delu leta in ob dobri oskrbi z dušikom. Opažena učinka pri gojenju rastlin na povečani koncentraciji CO₂ sta povečana koncentracija nestrukturnih ogljikovih hidratov v listih in povečano C:N razmerje v tleh. Še pomembnejši odziv na povečan CO₂ pa predstavlja vedno večje vnašanje C v tla preko koreninskih izločkov in odmiranja korenin, kar vodi do povečanja mikrobne biomase. Tudi v sušnem delu leta se lahko mikrobna biomasa v tleh poveča zaradi vlažnosti, ki je posledica večjega privzema vode zaradi povečanega CO₂. Kot posledica povečane mikrobne aktivnosti se lahko v tleh zmanjša dostopnost N zaradi hitre mikrobne reciklaže N. V ugovor tej tezi obstaja kar nekaj dokazov, ki dokazujejo zmanjšanje mikrobnega razkroja na travnikih, ki so bili izpostavljeni povečani koncentraciji CO₂. Povečan CO₂ naj bi, zaradi povečane rasti rastlin, zmanjšal količino dostopnega N za mikrobno delovanje in omogočal večje kopičenje C v tleh. Rezultati različnih eksperimentov, izvajanih na traviščih kažejo, da se izločanje C v takih razmerah poveča. Na rastišču trpežne ljujke, ki je bilo redno košeno, so določili in izračunali vrednosti izločenega C v tla. V času dveh let, kolikor naj bi trajal poskus, se je v tla, ki so bila izpostavljena normalnim koncentracijam CO₂ izločilo 458 g m⁻² C in 779 g m⁻² tam, kjer je bila povečana koncentracija CO₂. Raziskave so pokazale, da se je velik del tega dodatnega C uskladiščil v podzemno koreninsko biomaso (Jones in Donnely, 2004).

Izsledki sorodnega poskusa, izvedenega v Italiji blizu kraja Viterbo, ki je tri leta trajal na rastiščih topolov (*Populus alba*, *Populus nigra*) opremljenih s sistemom FACE kažejo močan vpliv povečanega CO₂ na vnos C preko odmrta korenin, ki pa se pokaže šele v drugi rastni sezoni. Preučevali so tudi vnos C preko odpadnega listja. Meritve so izvajali tako, da so v drugi in tretji rastni sezoni pod drevesa postavili plastične koše površine 0.13 m², ki so omogočili lovljenje odpadnih listov. Odpadno listje so pobirali dvakrat mesečno, jih v laboratoriju presušili in z »litter bag« (vrečke za odpad) metodo, to je metodo, ki se uporablja za merjenje hitrosti odpada, analizirali in določili koncentracijo C. Med poskusno dobo je povprečen kumulativni vnos C iz odpadnega listja znašal 505 g C m⁻². Ob upoštevanju domneve, da vse listje, ki ni bilo podvrženo razgradnji, sčasoma vstopi v tla, izračunan vnos C iz nadzemnih zelenih delov v tla rangira med 359

in 441 g C m⁻² in velja za vse rastline v poskusu. Na ta način je bila izmerjena maksimalna količina vnešenega C v mejah »litter bag« metode, ki pa naj bi bila precejšnja. Vseeno pa ta količina predstavlja manj kot polovico domnevnega vnosa C v tla preko eksternega mikoriznega micelija. To ne zmanjšuje vloge listne stelje za zbiranje C, vendar rezultati kažejo, da je v tem sistemu dominantna pot vnosa ogljika v organski bazen preko zunaj koreninskega mikoriznega micelija. Ocenjen vnos preko zunajkoreninskega mikoriznega micelija naj bi predstavljal 62 % vsega na novo vnešenega C in močno presega vnos C preko finih korenin.

Poleg ektomikorize so bile korenine kolonizirane tudi z AM glivami, katerih produkt glomalin je močno doprinesel k nastanku nove organske snovi v tleh zaradi svoje trdoživosti, saj je potreben čas za razkroj glomalina kar med 6 in 42 let (Godbold in sod., 2006).

AM glive imajo pomembno vlogo pri kroženju ogljika. Delež ogljika, ki se iz rastlin transportira k AM glivam, dosega vrednost nekje med 10 in 20 % neto v fotosintezi asimiliranega ogljika, čeprav nekateri navajajo, da se lahko številka giblje tudi med 5 % do 85 % vsega ogljika, ki ga rastlina sintetizira. AM glive lahko potencialno vplivajo na rastline, ki rastejo v okolju s povečano koncentracijo CO₂ na več načinov: 1) vplivajo na homeostatsko prilagoditev posamezne gostiteljske rastline, 2) spreminjajo odziv celotne populacije rastlin na povečano koncentracijo CO₂, 3) odzovejo se različno na različne gostiteljske rastline in s svojo povratno informacijo ustvarjajo znotraj ekosistema različne združbe rastlin s podobnim odzivom, 4) oskrbujejo tla s povečano koncentracijo ogljika in tako vplivajo na kroženje ogljika v sistemu (Tuba in sod. 2003).

Večina raziskovalcev, ki so se ukvarjali z vplivom CO₂ na AM, je prišla do zaključka, da se je pri povečani koncentraciji CO₂ odstotek kolonizirane korenine z AM glivami povečal, prav tako se je povečala frekvenca koloniziranosti, čeprav tega vedno ni bilo mogoče zaznati. Navadno pa drži, da če se koreninska masa gliv poveča, potem se poveča tudi skupna biomasa AM gliv na rastlino. Pri poskusu s FACE zaplinjevanjem so tudi preučevali, kaj se dogaja s koncentracijo glomalina pri povečani koncentraciji CO₂ in prišli do izsledka, da se je povečal tako obseg ekstraradikalnega micelija, kot tudi koncentracija glomalina. Prav tako se je povečala stabilnost agregatnih delcev v tleh (Rillig in sod., 2001).

2.6 NARAVNI IZVIRI CO₂

Naravni izviri, ki jih imenujemo tudi mofete, nastajajo na mestih, kjer so bila v preteklosti ali sedanosti vulkansko aktivna. Za nastajanje CO₂ so potrebne karbonatne kamnine, ki se v zemeljski notranjosti pri visoki temperaturi in pod visokim tlakom talijo. Tako nastali CO₂ lahko ostane ujet v podzemnih bazenih, lahko pa preko večjih ali manjših lukenj, razpok prihaja na površje (Pfanž in sod. 2004). Če se na poti na

površje sreča s podtalnico in jo obogati, nastane z ogljikovo kislino bogata naravna mineralna voda. Na območju, kjer je potekala naša raziskava, ji pravijo slatina.

Manjše vrelce plinastega CO₂ in njegove mokre izvire (izhajanje plina izpod rek, jezer...) najdemo po vsem svetu. Raztreseni so tudi po evropskih državah: v Avstriji, na Češkem, v Franciji, Grčiji, Islandiji, Italiji, Madžarski, Nemčiji, Portugalski, Romuniji, Sloveniji in Španiji (Raschi in sod., 1997, cit. Po Maček, 2004).

Na lokacijah naravnih izvirov je lahko koncentracija CO₂ v tleh veliko večja od običajne talne koncentracije CO₂ (pod 1 %, odvisno od tipa tal in okoljskih razmer) (Brook in sod., 1983 cit. po Maček, 2004). Pojav, ko je kisika v tleh le od 3 do 12,5 % se imenuje hipoksija, to je pomanjkanje kisika v tleh. V primeru, ko kisika sploh ni, govorimo o anoksiji (Buchanan, 2000 cit. po Maček, 2004). Običajna okoljska atmosfera CO₂ je 0,03 % in ni nevarna. Z naraščanjem koncentracije postaja CO₂ toksičen. Pri 5 % koncentraciji povzroča draženje, pri vdihavanju 10 % CO₂ pa človek izgubi zavest. Koncentracija CO₂, ki izhaja iz mofet, je ekstremna, tudi 100 %. Ob vrelcih se pojavljajo mrtve žuželke, manjši plazilci, sesalci in ptiči (Pfanzen in sod., 2004).

Neposredno ob vrelcih na travniku je lahko koncentracija v tleh ekstremno velika in lahko dosega 100 % koncentracijo CO₂ (Pfanzen in sod., 2004). Količina CO₂ v zraku okrog vrelcev niha med 0,0036 in 1 % glede na vremenske razmere. Pri redčenju in mešanju geogenega CO₂ z atmosferskim zrakom imata pomembno vlogo hitrost in smer vetra. Tik ob vrelcih ni vegetacije oz. je zelo prizadeta. Z oddaljenostjo od vrelcev se inhibitorni učinek CO₂ zmanjšuje in višina rastlin se večja. Raziskave so pokazale, da je rast negativno korelirana s koncentracijo CO₂ v tleh (Vodnik in sod., 2006). Meritve talne koncentracije plinov se zato uporabljajo za določitev plinskega režima, kateremu so izpostavljene rastline na območju mofete.

2.6.1 Učinki naravno povečane koncentracije CO₂ na rastline

Povečana talna in atmosferska koncentracija CO₂ na območju mofet vpliva na rast in razvoj rastlin. V več raziskavah ob naravnih izviroh, ki ponujajo vpogled v dolgoročne učinke CO₂ na rastline in njihovo potencialno prilagoditev (npr. na spremenjeno vsebnost hranil v listih skozi daljšo dobo) (Tuba in sod., 2003), je bilo ugotovljeno, da močno povečana koncentracija CO₂ zavira rast in vpliva na fenološki razvoj rastlin. Rastline, ki so rasle ob vrelcih, so bile manjše, pozneje so cvetele ali sploh ne, njihova rastna doba se je skrajšala in staranje listov je bilo hitrejše. Na te spremembe v fenofazah in predčasnem staranju lahko vpliva zmanjšan delež dušika in povečano C:N razmerje v listih, ki je najverjetneje posledica spremenjene dostopnosti hranil zaradi povečane talne koncentracije CO₂. Talni CO₂ in O₂ sta v obratnem sorazmerju, kar pomeni, da je v tleh ob mofetah manj kisika. Ta primanjkljaj vodi v zmanjšanje razpoložljivosti mineralnih hranil zaradi zakasnjene mineralizacije in redoks reakcij, ki potekajo v tleh. Poleg tega pa ima lahko škodljiv vpliv na rast korenin in na njihovo presnovo (Maček, 2004). V raziskavah predpostavljajo (Maček, 2004), da se nekatere vrste na povečanje talne koncentracije CO₂ odzivajo z razvojem korenin ob površini oz.

v zgornjih plasteh tal. S spremenjeno zgradbo korenin tj. z manj učinkovito zgradbo za privzem hranil zaradi spremenjenih anatomskih značilnosti, je prikrajšana celotna rastlina. To se med drugim lahko kaže v manjši koncentraciji elementov, kot so fosfor, kalij in žveplo v listih rastlin.

Poleg učinkov CO₂ na procese v tleh je, vsaj za najbolj izpostavljene dele rastišča oz. obdobja, ko se zaradi mirnega ozračja vzpostavijo tudi v atmosferi velike koncentracije tega plina, moč pričakovati tudi neposreden učinek CO₂ na procese v nadzemnih delih (fotosinteza in transpiracija) (Pfanž in sod., 2004).

Glede na našete negativne vplive ekstremno povečanih koncentracij CO₂ na rastline pa je seveda moč pričakovati, da se bo ta učinek CO₂ odražal tudi na prisotnosti in obsegu mikorize ter v količini glomalina v tleh.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS LOKACIJ

Podatki, obravnavani v tej diplomski nalogi, so zbrani na dveh različnih lokacijah.

Prva lokacija, kjer se je izvajal poskus, se nahaja v severovzhodni Sloveniji, blizu kraja Radenci. Severovzhodna Slovenija je znana po geotermalnih vrelicah, kar se s pridom izkorišča za zdraviliški turizem. Raziskovalci katedre za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete v Ljubljani že vrsto let preučujejo dogajanje na odkritih mofetah ob regionalni cesti Stavešinci–Ivanjševci. Mofete se nahajajo na 3000 m² velikem agrarnem zemljišču, kjer iz nekaj vrelecev na dan prihaja zelo čisti CO₂ brez primesi drugih plinov. Na območju največjega izhajanja CO₂ so domačini zaradi premajhnih pridelkov opustili pridelovanje kulturnih rastlin. Tako je del poskusne površine opuščen in zarasel, predvsem s travami, pionirskimi zelmi in neofiti. V letu 2005, ko je bil izveden poskus za to diplomsko delo, je bilo poskusno območje zatravljeno.



Slika 4: Poskusno polje v Stavešincih. Na sliki je prikazan nepokošen del travnika na območju mofete, razbrati je moč zavrto rast v osrednjem delu te površine za katero je odgovorna velika koncentracija CO₂ (Vodnik in sod., 2006)



Slika 5: Fotografija poskusnega polja v Bossoletu (foto: Vodnik)

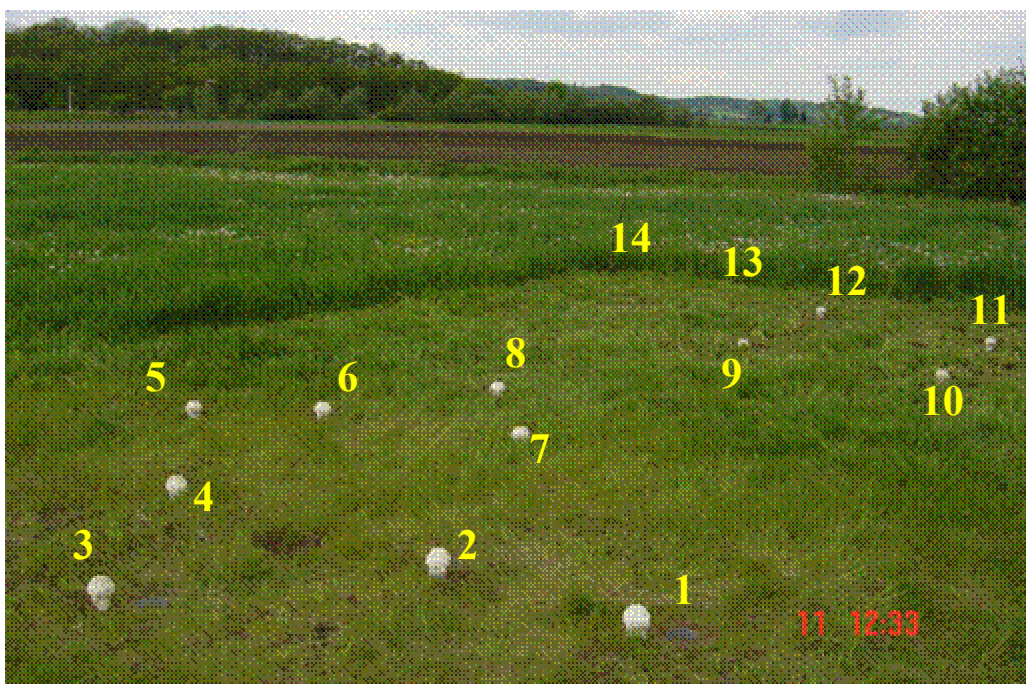
Drugo poskusno območje pa se nahaja v Italiji, natančneje v Toskani blizu vasi Rapalano in se imenuje Bossoletu. To območje je ravno tako poznano po geotermalnih vrelih in se nahaja v bližini toplih. Zaradi varnosti je območje zagrajeno z zidom. Gre za udorno dolino, ki ima v premeru približno 80 metrov in globine 20 metrov, kjer na dnu in na pobočjih izhaja zelo čisti (99 %) CO₂ v velikih količinah, tako da lahko kdaj vrednost v zraku doseže tudi od 80 do 90 %. Rastje v dolini je raznoliko, raste vse od trav npr. Plazeča šopulja (*Agrostis stolonifera*), zelnatih dvokaličnic kot je ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata*), do lesnatih rastlin na pobočju (črnika: *Quercus ilex*, puhasti hrast: *Q. pubescens*), vendar je rast tam, kjer je izhajanje CO₂ največje, močno omejena.

V Stavešincih ni opaziti tako ekstremnega nihanja oziroma sprememb v koncentraciji atmosferskega CO₂ tekom 24-urnega cikla kot v Bossoletu. Tu se, zaradi oblike doline in nižjih temperatur zraka, tekom noči nakopiči velika koncentracija CO₂ na dnu doline. Koncentracije CO₂ lahko presegajo tudi 80 %, kar zna biti tudi nevarno. Kadar so koncentracije tako velike, je možno opaziti mejo med zrakom s povečano koncentracijo CO₂ in zrakom z manj CO₂. Do tega pojava pride zaradi različnih gostot zračnih mas in

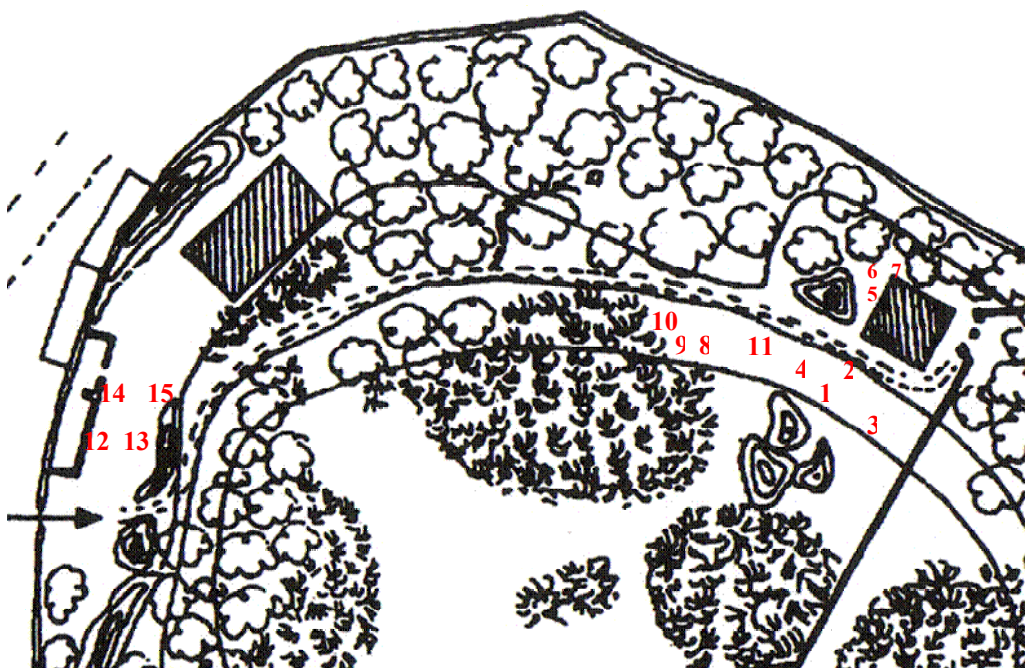
se kaže kot meglica na dnu doline. To se dogaja vsak dan med 7 in 9 uro zjutraj, potem pa se zaradi povečane temperature zraka in vetra koncentracija CO₂ zmanjša.

3.2. METODE POSKUSA

Metodi poskusa se pri obeh lokacijah nista razlikovali. Poskus je potekal tako, da so bili v začetku rastne sezone na obeh lokacijah postavljeni ovratniki, preko katerih se je merilo pretok in koncentracijo CO₂. Ovratniki so se postavljali glede na vzorce rasti, po nekaj na delih ploskve, kjer rast ni bila omejena in potem še tam, kjer je bila rast malo oz. močno omejena. V Bossoletu so ovratniki postavljeni na rastišču plazeče šopolje (*Agrostis stolonifera*). Pri poskusu v Stavešincih je bilo štirinajst ovratnikov, pri Bossoletu pa jih je bilo petnajst.



Slika 6: Fotografija poskusnega polja v Stavešincih. Na fotografiji so označena mesta, kjer smo merili tok CO₂ iz tal in vzorčili tla za analizo glomalina.



Slika 7: Shema tlorisa poskusnega polja v Bossoletu. Zemljišče je zaradi varnosti ograjeno z obzidjem. Tam, kjer je puščica je vhod, ki je na vznožju doline. Na sredini slike je najnižja točka doline. Tu je največ vrečev CO₂, zato je raste tu najbolj prizadeto, kar je vidno tudi s sheme. Mesta označena s številkami predstavljajo lokacije merjenja toka CO₂.(van Gardinger in sod., 1997)

3.3 MERJENJE PRETOKA CO₂

Meritve pretoka CO₂ skozi ovratnike so bile izvedene z aparatom Li-6800 (Licor, ZDA). Z aparatom meritve izvajamo tako, da najprej izmerimo tarčno vrednost koncentracije CO₂ nad ovratnikom, tako da komora za merjenje leži ob ovratniku. Nato komoro postavimo na ovratnik. Aparat s prečrpavanjem zmanjša koncentracijo CO₂ v komori in nato meri čas, ki je potreben, da se koncentracija znotraj komore izenači s tarčnimi vrednostmi. Tako dobimo pretok in koncentracijo CO₂ v ovratniku.

Meritve fluksov so se v Stavešincih začele maja 2005 in so potekale vsaj enkrat ali dvakrat mesečno do novembra istega leta. V Bossoletu pa so bile meritve izvedene le enkrat, in sicer maja leta 2005. Ob tej priložnosti so bili tudi pobrani vzorci tal za Bradfordovo analizo. Pred vsako meritvijo je bilo potrebno ovratnik očistiti vseh rastlin, da ne bi vplivale na rezultate meritev.

3.4 VZORČENJE TAL

V Stavešincih smo tla za analizo glomalina vzorčili tako, da smo postrgali približno 10 gramov zgornje plasti tal (0–2 cm) znotraj vsakega ovratnika posebej in vse ustrezno zapakirali in etikirali. Vzorčenje je potekalo oktobra, delo pa se je nato nadaljevalo v laboratoriju, kjer smo vzorce posušili. Sušenje je potekalo 48 ur v sušilniku na 60° C. Po sušenju smo vzorce v terilnici zdrobili in jih nato presejali skozi sito z 2 mm odprtini in shranili v označenih papirnih vrečkah do začetka analize.

3.5 LABORATORIJSKO DELO

3.5.1 Ekstrakcija lahko izločljivega glomalina EEG (easily extractable glomalin)

Omeniti je potrebno, da smo ekstrakcijo iz posameznega ovratnika izvajali v treh ponovitvah. Ekstrakcija EEG je potekala tako, da smo v centrifugirke odtehtali 1 g tal, jih prelili z 8 mL 20 mM natrijevega citrata in jih avtoklavirali 30 min pri 120° C in tlaku 1,2 bar. Po avtoklaviranju smo centrifugirke vzeli iz avtoklava, jih malo ohladili, nato pa jih centrifugirali na 4500 rpm za 15 minut. Po centrifugiranju smo z merilnim valjem izmerili posamezne volumne ekstraktov, jih prelili v posebne stekleničke, jih ustrezno označili in shranili v hladilnik na 4° C, kjer so čakale na nadaljnje analize. Z usedlinami, ki so ostale v centrifugirkah, smo nadaljevali ekstrakcijo skupnega glomalina (3.5.2).

3.5.2 Ekstrakcija skupnega glomalina TG (total glomalin)

Ekstrakcija TG poteka podobno kot ekstrakcija EEG. Razlika v postopku je v tem, da nastale usedline prelijemo z 8 mL 50 mM natrijevega citrata in avtoklaviramo 1 uro pri 120° C in tlaku 1,2 bar. Po avtoklaviranju vzorce ravno tako centrifugiramo pri 4500 rpm za 15 min. Nato supernatante (ekstrakte) odlijemo v posamezne stekleničke in cikl ponavljamo tako dolgo, dokler je še opaziti rdečo-rjavo barvo v ekstraktu, ki je značilna za glomalin oz. za proteine, ki naj bi prenesli razmere avtoklaviranja (BSRP). Supernatante posameznih ciklov smo združevali v skupen ekstrakt za posamezen vzorec oz. ponovitev, kateremu smo na koncu izmerili volumen. Potem smo iz skupnega ekstrakta odpipetirali 1mL v Eppendorfove epruvetke in jih nato centrifugirali na 10000 rpm. S tem smo odstranili zadnje delce v supernatantu vzorca. Te vzorce smo manj kot v tednu dni uporabili za analizo, do takrat pa smo jih hranili v hladilniku.

3.5.3 Analiza proteinov (Bradfordov test)

Gre za standardno analizo količine proteinov v vzorcu (Bradford, 1976, Wright in Upadhyaya., 1996). V našem primeru nam Bradfordov test pokaže koncentracijo lahko izločljivega in skupnega glomalina v vzorcih, ki smo jih ekstrahirali. Metoda ni specifična za analizo glomalina, ker izmeri vsak protein, ki se ohrani skozi predhodno že

omenjeno ekstrakcijo pri ekstremnih ekstrakcijskih razmerah. Pri tem testu gre za reakcijo, katere produkt je sprememba barve. Barvilo (Bio-rad protein assay) je rdeče barve (dvojna protonizirana oblika, ki je manj stabilna kot protonizirana). Ko smo ga dodali v protein, se je obarvalo modro (neprotionizirana oblika, ki je manj stabilna kot protonizirana). To spremembo smo ovrednotili s fotometričnimi meritvami. Da so bile te hitrejše, smo v našem primeru uporabili kar ploščice, ki omogočajo meritve večjega števila vzorcev hkrati. Spremembe smo določali s primerjavo umeritvene krivulje standarda z našimi vzorci. Za standard smo uporabili goveji serumski albumin – BSA (bovine serum albumin)

Najprej smo pripravili raztopino pufra PBS tako, da smo v 80 mL deionizirane vode raztopili 0,730 g pufra PBS. Ta količina je zadostovala za tri plošče.

Priprava vzorcev: Ekstrakte smo centrifugirali pri 1000 rpm. Po barvi vzorcev smo določili količino vzorca, ki smo ga odpipetirali v luknjice na plošči, in sicer za lahko izločljivi glomalin 5 μ L in za skupni glomalin po 10 μ L tako, da so bile končne koncentracije glomalina znotraj razpona koncentracij standarda pri umeritveni krivulji. Za vsak vzorec smo delali tri ponovitve.

Priprava plošče lahko izločljivega glomalina: najprej smo odpipetirali 195 μ L PBS v trikrat toliko luknjic kolikor je bilo vzorcev. Zatem smo iz vsakega ekstrahiranega vzorca dodali 5 μ L vzorca, pri čemer smo dosledno menjavali nastavke za pipete (en nastavek smo uporabili za en vzorec, ki smo ga dali v tri luknjice). Za ploščo skupnega glomalina smo odpipetirali 190 μ L PBS in 10 μ L vzorca.

Za umeritveno krivuljo smo prav tako delali tri ponovitve. V prve tri luknjice smo odpipetirali 200 μ L PBS, v druge tri 150 μ L PBS in 50 μ L BSA (standarda), v naslednje tri 100 μ L PBS in 100 μ L BSA, spet naslednje 50 μ L PBS in 150 μ L BSA in v zadnje tri 200 μ L BSA.

V tako pripravljeno ploščico smo tam, kjer so bile luknjice zapolnjene dodali 50 μ L barvila (Bio-Rad protein dye) in ga previdno zmešali, da ni nastalo preveč mehurčkov. V času 5 min smo z iglo predrli mehurčke, da ne bi vplivali na rezultate. Po točno pretečenem času smo s čitalcem plošč (Dynex MRX, Thermolabsystems) pri absorpciji 595 nm odčitali rezultate. Poskus smo ponovili za naslednje plošče.

3.5.4 Izračun količine glomalina

Čitalec plošč nam je izpisal absorbance vzorcev. S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje smo izračunali količino glomalina v posamezni luknjici elisa ploščice. Nato smo to količino (μ g/luknjico) preračunali v μ L/luknjico, pri čemer smo upoštevali volumen vzorcev, ki je bil za lahko izločljiv glomalin 5 μ L/luknjico in za skupni glomalin 10 μ L/luknjico. Za končni izračun količine glomalina na posamezen vzorec smo še

potrebovali volumen ekstrakta (supernatanta) in maso tal. Celotna formula za izračun količine glomalina je naslednja:

$$K.G. \left[\frac{mg}{g} \right] = \frac{Kon.G. [\mu g]}{V_v [\mu l]} \cdot \frac{V_e [\mu l]}{M_v [g]} \quad \dots(1)$$

Pomen oznak pri enačbi:

K. G	količina glomalina na maso tal (mg/g)
Kon. G.	koncentracija glomalina, odčitana iz umeritvene krivulje (μg)
V _v	volumen vzorca ekstrakta, dodanega na luknjico ploščice (μl)
V _e	celotni volumen ekstrakta (μl)
M _v	masa vzorca tal (g) upoštevajoč delež skeleta

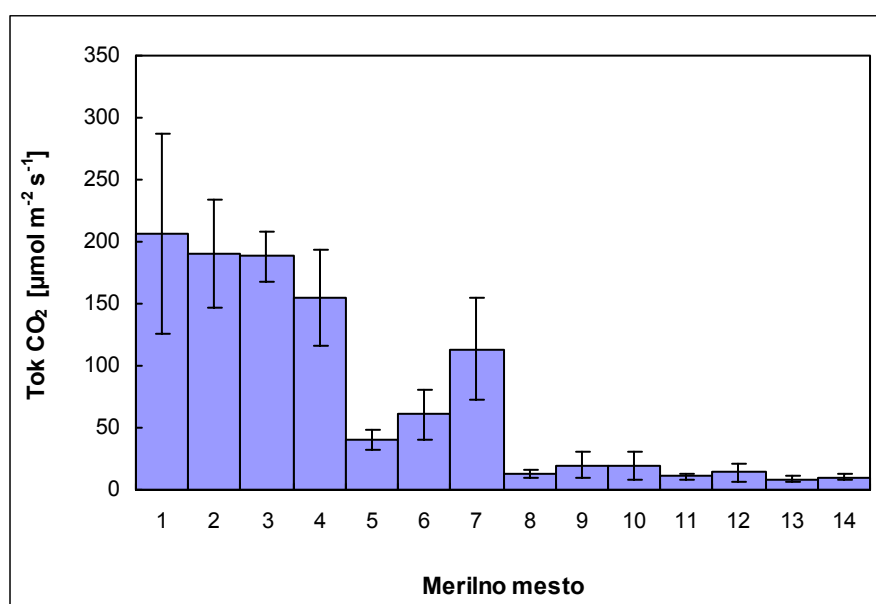
3.6 STATISTIČNE METODE

Rezultate meritev iz analiz smo obdelali z metodami opisne statistike (povprečje, standardna napaka). Zvezo med tokom CO₂ in količino glomalina smo ovrednotili s Pearsonovim korelacijskim koeficientom. Uporabili smo program Excel (Microsoft) in Statgraph (Manugistic, ZDA)

4 REZULTATI

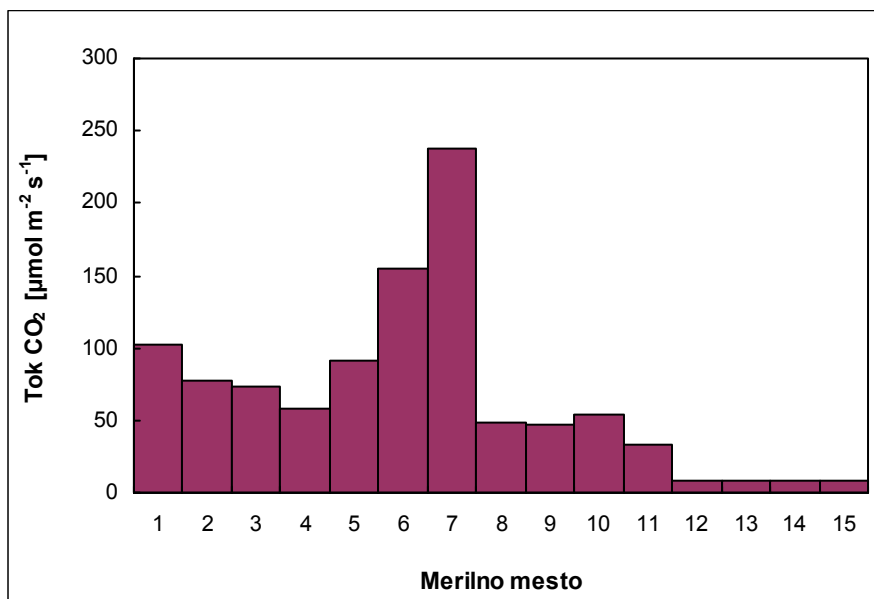
4.1 TOK CO₂

Meritve pretoka so potekale na obeh poskusnih poljih enako, in sicer z merilnim aparatom Licor 6800. Sezonsko povprečje pretoka CO₂ v Stavešincih se je zelo razlikovalo po lokacijah oz. po posameznih ovratnikih. Vrednosti sezonskega pretoka CO₂ so bile od 8 μmol m⁻² s⁻¹, pa do več kot 200 μmol m⁻² s⁻¹. Najmanjša sezonska vrednost toka CO₂ je bila izmerjena na ovratniku št. 8 in sicer 8,71 μmol m⁻² s⁻¹, največjega pa 206,34 μmol m⁻² s⁻¹ na ovratniku št. 7.



Slika 8: Prikaz povprečnega sezonskega toka CO₂ za rastišče lokacije v Stavešincih. Meritve so potekale od julija do novembra 2005, vsaj enkrat ali dvakrat mesečno, skupno število meritev pa je bilo deset

V Bossoletu je bil razpon toka CO₂ še širši, in sicer od 7,8 μmol m⁻² s⁻¹ pa do skoraj 239 μmol m⁻² s⁻¹. Kljub večjemu razponu pa so si toki skozi posamezne ovratnike veliko bolj podobni kot v Stavešincih. Pri izmerjenih vrednostih v Bossoletu najbolj izstopa ovratnik št. 7, kjer je bil izmerjen največji tok CO₂, in sicer 238,4 μmol m⁻² s⁻¹. Nekoliko izstopajo tudi ovratniki 12, 13, 14 in 15. Na teh ovratnikih so izmerjene vrednosti najmanjše in se gibljejo okoli 8 μmol m⁻² s⁻¹. Na teh ovratnikih so izmerjene najnižje vrednosti toka CO₂. Gre za merilna mesta na vrhu doline v Bossoletu in so oddaljeni od večjih izvirov CO₂. Pri rezultatih, dobljenih v Bossoletu, ne moremo govoriti o sezonskem povprečju pretoka CO₂, saj so bile meritve izvajane le dvakrat v sredini meseca maja 2005, tako da so dobljeni rezultati povprečje teh dveh meritev.



Slika 9: Prikaz pretoka CO₂ skozi ovratnike v Bossoletu. Meritve so potekale maja 2005

4.2 VSEBNOST EEG IN TG

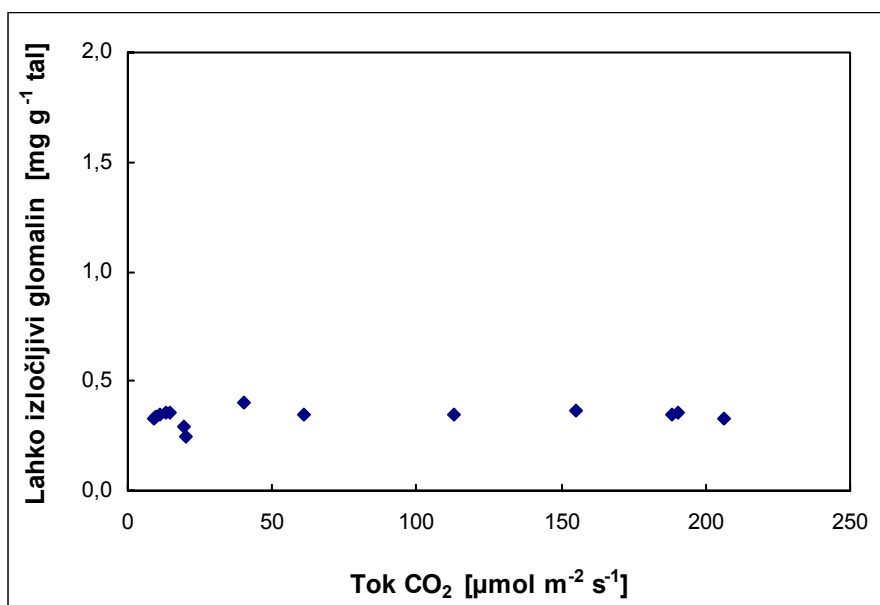
Z Bradfordovo analizo smo določili vsebnost glomalina v vzorcih.

Pri vzorcih iz Stavešincev se je vsebnost lahko izločljivega glomalina, to je tistega, ki ga pridobimo s prvo ekstrakcijo, gibala med 0,25 in 0,4 mg g⁻¹. Vsebnost skupnega glomalina pa je bila med 0,9 in 1,5 mg g⁻¹.

Pri vzorcih iz Bossoleta je bila vsebnost lahko izločljivega glomalina med 0,2 in malo več kot 0,4 mg g⁻¹. Skupnega glomalina pa je bilo veliko več kot v Stavešincih, in sicer so se vrednosti gibale med 1,2 in skoraj 3,8 mg g⁻¹.

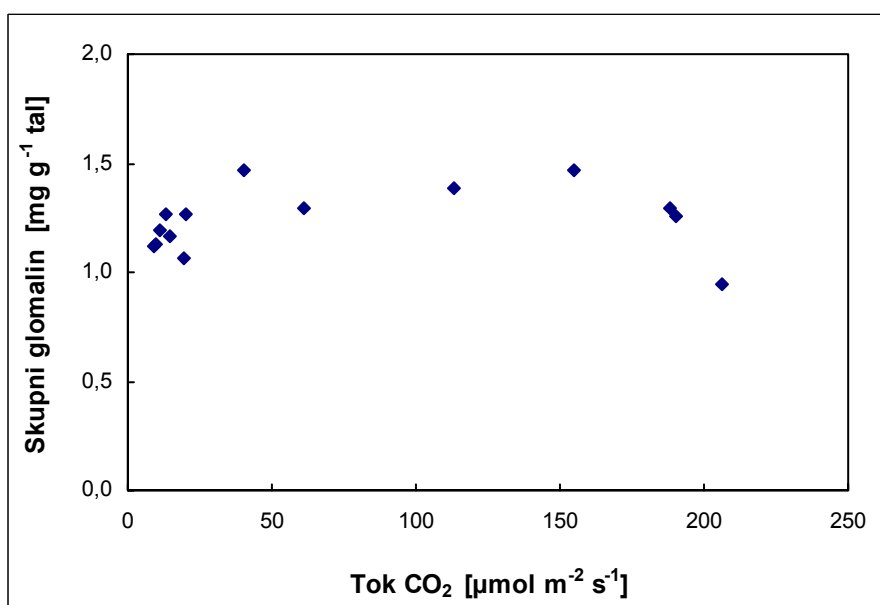
4.3 VSEBNOST GLOMALINA GLEDE NA TOK CO₂

Največja vsebnost lahko izločljivega glomalina v Stavešincih je znašala 0,5 mg g⁻¹ in je bila izmerjena na ovratniku 9, kjer je bil sezonski povprečni tok CO₂ 19,91 μmol m⁻² s⁻¹. Najvišja vrednost lahko izločljivega glomalina pa je bila 0,4 mg g⁻¹ pri toku 40,12 μmol m⁻² s⁻¹ (ovratnik št. 5).



Slika 10: Vsebnost lahko izločljivega glomalina glede na tok CO₂ iz tal, Stavešinci

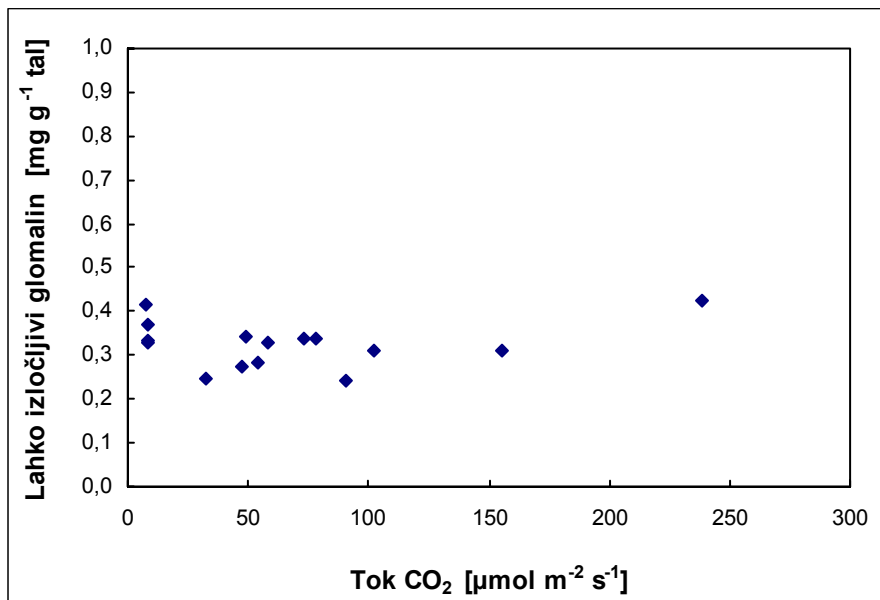
Skupnega glomalina v Stavešincih je bilo najmanj pri toku 206,34 μmol m⁻² s⁻¹, na ovratniku 1, in sicer 0,94 mg g⁻¹. Največ pa ga je bilo 1,47 mg g⁻¹ pri toku 154,9 μmol m⁻² s⁻¹ na ovratniku 4.



Slika 11: Vsebnost skupnega glomalina glede na tok CO₂ iz tal Stavešinci

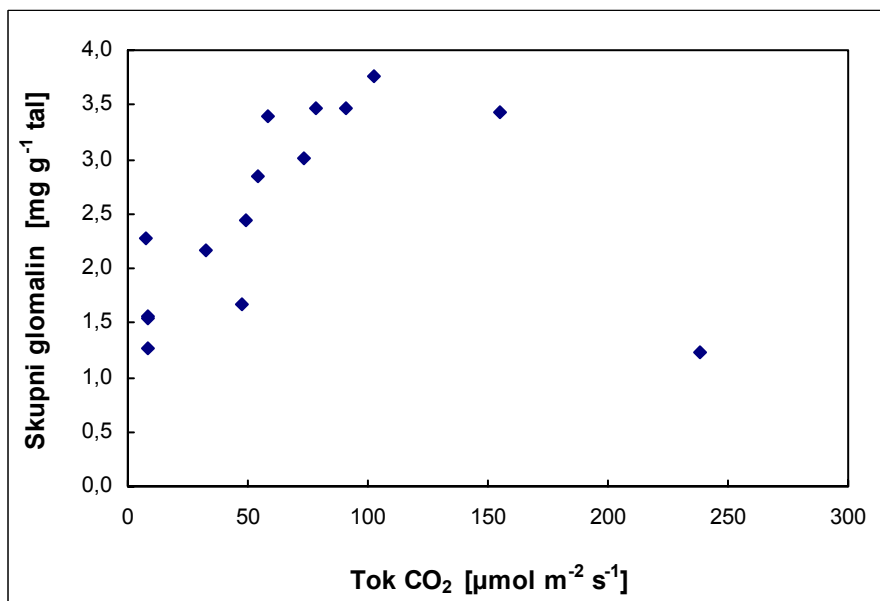
V Bossoletu je bila najmanjša vrednost lahko izločljivega glomalina 0,24 mg g⁻¹, določena pri izmerjenemu toku CO₂ 90,9 μmol m⁻² s⁻¹, na ovratniku 5. Največja

vrednost lahko izločljivega glomalina 0,42 mg g⁻¹ pa je bila dobljena pri toku 238,4 μmol m⁻² s⁻¹, to je na ovratniku 7.



Slika 12:: Vsebnost lahko izločljivega glomalina pri vzorcih iz Bossoleta, glede na tok CO₂ iz tal

Najmanjša vsebnost skupnega glomalina v Bossoletu je bila izmerjena pri vzorcih iz 7. ovratnika, pri toku 238,4 μmol m⁻² s⁻¹ in je znašala 1,23 mg g⁻¹. Največ skupnega glomalina pa je bilo znotraj 1. ovratnika, kjer je bil tok 102,1 μmol m⁻² s⁻¹, njegova vsebnost pa je znašala 3,77 mg g⁻¹.



Slika 13: Vsebnost skupnega glomalina v Bossoletu glede na tok CO₂ iz tal

Če izvzamemo podatke za dve lokaciji z najbolj ekstremnim tokom CO₂ iz tal lahko ugotovimo, da obstaja med tokom CO₂ in skupnim glomalinom za Bossoleto precej tesna pozitivna korelacija (Pearsonov korelacijski koeficient je 0.89).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Tok CO₂ iz tal

Parcialni tlak CO₂ v talnem zraku se lahko zelo razlikuje od tistega v atmosferi. Zaradi respiratorne aktivnosti korenin in talnih organizmov je lahko koncentracija CO₂ v tleh 2-3 krat večja od atmosferske. Količina CO₂ v tleh variira sezonsko, kot tudi dnevno. Nanjo močno vpliva nekaj dejavnikov, kot so: vsebnost vode v tleh, temperatura in vegetacija. Pfanž in sod. (2004) poročajo, da je moč v travniških tleh na globini 20 cm izmeriti do 1,5 % CO₂. Koncentracija CO₂ v tleh je poleg prevodnosti tal za pline in atmosferske koncentracije CO₂ glavni dejavnik, ki določa hitrost toka CO₂ iz tal v ozračje. Vodnik in sod. (2004) poročajo o veliki povezanosti talnih koncentracij CO₂ in toka CO₂ iz tal za območje naravnega izvira Stavešinci (korelacijski koeficient 0,92). Pregled literature pokaže, da je raziskav, v katerih merijo tok CO₂ iz tal, bistveno več kot tistih, ki navajajo koncentracije tega plina v tleh. Številne študije so pokazale, da je tok CO₂ iz tal prostorsko heterogen, to heterogenost pa lahko povežemo s porazdelitvijo mikrobne in koreninske biomase ter heterogenostjo fizikalnih in kemičnih lastnosti tal (Vodnik in sod., 2006).

Tok CO₂ iz travniških tal je sezonsko spremenljiv. Maestre in Cortina (2003) sta na polsušnih mediteranskih tleh merila pretok CO₂. Vrednosti so nihale med 0,17 in 0,31 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Te vrednosti se zelo ujemajo z vrednostmi tokov CO₂, ki naj bi veljale za globalno travinje. Po mnenju Raicha in Schlesingerja (1992) naj bi vrednosti toka CO₂ za globalno travinje znašale med 0,29 do 0,31 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maestre in Cortina (2003) navajata tudi primer polsušnega travinja v Northern Great Plains, kjer naj bi bile vrednosti toka večje, in sicer od 0,9 do 1,13 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Še večji tok CO₂ iz tal lahko izmerimo na travnikih zmernege pasu, kjer je razpoložljivost vode večja. Na to kažejo rezultati poskusa izvedenega na Japonskem, kjer so na mešanem travniku, kjer so bile prisotne tako C3 kot C4 rastline izmerili vrednosti toka CO₂ v tleh, ki so znašale 5 in 12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Wang in sod, 2005). Podobne rezultate so dobili tudi pri poskusu izvedenem v Kanadi. Tu so prav tako kot v našem poskusu merili vrednosti toka CO₂ z aparatom Li6800. Meritve so se izvajale v letih 2001 in 2002 na mešanem travniku, na območju, kjer je dolgoletno povprečje padavin okoli 400 mm. V letu 2001 je bila vsota padavin kar za polovico manjša od dolgoletnega povprečja, temu primerno so bili tudi majhni toki CO₂ v tleh in so znašali 0,5 do 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. V letu 2002 pa so bile padavine bolj obilne od dolgoletnega povprečja in vrednosti tokov CO₂ so bile med 2 in 9 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Flanagan in Johnson, 2005). Takšne vrednosti smo izmerili tudi ob naših meritvah v Stavešincih, kjer se je tok na lokacijah, ki so bile privzete kot kontrolne, gibal od 2-15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Nihanja toka CO₂ lahko po literaturi najbolje povežemo z nihanjem respiratorne aktivnosti tal, ki pa je odvisna od okoljskih dejavnikov, predvsem od temperature in vsebnosti vode v tleh. Na kontrolnih lokacijah v Stavešincih, to je tam, kjer naj ne bi bilo povečanega toka CO₂, smo v poletnih mesecih izmerili tudi do trikrat večje vrednosti toka CO₂ v tleh kot v jesenskih mesecih. Povečan tok v poletnih mesecih je posledica večje respiratorne aktivnosti talnih mikroorganizmov in korenin zaradi ugodnejših temperatur in večje vodne razpoložljivosti.

Na poskusnih poljih v Stavešincih in Bossoletu, kjer so bile v okolici nekaterih ovratnikov koncentracije CO₂ 100%, so bili toki CO₂ tudi do dvajsetkrat večji od tistih v normalnih travniških tleh. Posledice tega so bile predvsem opazne pri rastlinah, ki so bile na takih območjih močno zavirane v rasti. Znano je, da povečana koncentracija talnega CO₂ vpliva na talne in koreninske procese: tako se lahko zaradi velikih koncentracij CO₂ znižata talni pH in redoks potencial, zmanjša dostopnost hranil, prihaja pa lahko tudi do motenj delovanja korenin. Omenjeni učinki se odražajo tudi v motnjah procesov v nadzemnih delih rastline, kot so fotosinteza, transpiracija in respiracija. Takšne učinke na nadzemne dele rastlin lahko pričakujemo predvsem v mirnem obdobju, to je takrat, ko ni izrazitega vetra in zračnih tokov in se koncentracije CO₂ povečajo tudi v nižjih plasteh atmosfere. Na območju mofete Stavešinci je zaradi odprtega terena za obogatitev atmosfere s CO₂ brezvetrje ključno, medtem ko je situacija v Bossoletu zaradi topografije drugačna. Za razliko od Stavešincev, kjer gre za ravno področje, je poskusno polje v Bossoletu udorna dolina. Tu je večina vrelcev CO₂ na dnu in ob vznožju te doline. Zaradi ohlajanja zračnih mas tekom noči prihaja do kopičenja CO₂, ki je težji od zraka, na dnu doline. Koncentracije lahko narastejo tudi do 90 % čistega CO₂ in vztrajajo tako dolgo, da se zrak zaradi sončnega sevanja v začetku dneva ne segreje in premeša. Rastline v Bossoletu so tekom noči bolj izpostavljene CO₂ kot v Stavešincih, saj so poleg stalnega toka geogenega CO₂ deležne tudi vsakodnevnega nočnega večurnega povečanja atmosferskega CO₂, ki direktno vpliva na nadzemne dele rastline in procese, ki se v njih dogajajo. Temu primerno je tudi rastje bolj okrnjeno v Bossoletu, kot v Stavešincih.

Izmerjene vrednosti tokov v Stavešincih lahko razdelimo v dve skupini, in sicer na tiste ovratnike z velikim in na tiste z majhnim tokom CO₂. Vrednosti tistih z velikim tokom so se gibale od 113 pa do 206 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. To je bilo na merilnih mestih 1, 2, 3, 4, 5, 7, kateri so si tudi najbližje vsaksebi in kjer je rastje najbolj prizadeto. Na ostalih merilnih mestih so bili toki manjši in so se gibali od 8 do 61 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pri merjenju toka CO₂ v Stavešincih je bilo na določenih lokacijah oz. ovratnikih moč opaziti veliko nihanje med posameznimi mesečnimi meritvami. Največjo variabilnost lahko opazimo na lokacijah z večjim tokom CO₂, predvsem na mestih, ki so mejni med deli mofete z največjimi koncentracijami talnega CO₂ in deli, kjer ne moremo govoriti o obogatitvi z geogenim CO₂. Na merilnem mestu 7, kjer je bilo variiranje toka CO₂ največje, smo na primer meseca novembra izmerili najmanjšo vrednost 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, največjo pa avgusta, ko je bil tok CO₂ kar 343 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Razlike v toku CO₂ so sezonsko, kot tudi dnevno značilne. Pričakovati je, da na tok CO₂ v delu mofete, ki ni podvržen

geogenemu CO₂, najbolj vplivata temperatura in vlažnost v tleh, ki sta zelo spremenljiva dejavnika. Na to kažejo tudi podatki, pri katerih so najmanjše vrednosti izmerjene jeseni, največje pa poleti. Na lokacijah, kjer je prisoten geogeni CO₂ je pričakovati bistveno manjši vpliv temperature tal na tok CO₂. Slednji je odvisen predvsem od dotoka CO₂ in zračne prevodnosti tal, ki pa je poleg fizikalnih lastnosti tal odvisna od vsebnosti vode v tleh.

V Bossoletu so se izmerjene vrednosti toka CO₂ v tleh gibale med 7 in 239 μmol m⁻² s⁻¹. Največji izmerjeni vrednosti sta bili na lokacijah 6 in 7, in sicer 155,4 in 238,4 μmol m⁻² s⁻¹. Na lokacijah 12, 13, 14 in 15 so bile vrednosti toka CO₂ najmanjše, vrednosti so se gibale okoli 8 μmol m⁻² s⁻¹. Ti ovratniki so bili postavljeni tam, kjer vrelcev CO₂ ni in so nam služili za kontrolo. Na preostalih ovratnikih so bile vrednosti toka CO₂ dokaj izenačene in so se gibale med 32 in 102 μmol m⁻² s⁻¹. Ker meritev nismo opravljali v rednih časovnih intervalih tekom sezone, temveč le v sredini maja 2005, ne moremo podati podatkov o sezonskem nihanju tokov CO₂ na posameznih merilnih mestih.

Pri primerjavi tokov CO₂ med tistimi na poskusnem polju v Stavešincih s tistimi v Bossoletu lahko trdimo, da so si vrednosti zelo podobne. Povprečje sezonskih tokov, brez kontrolnih ovratnikov, v Stavešincih znaša nekaj nad 80 μmol m⁻² s⁻¹. Enake povprečne vrednosti dobimo za Bossoleto, če izvzamemo meritve na kontrolnih lokacijah.

5.1.2 Vsebnost glomalina v tleh z območja mofet

Glomalin je stabilen, trdoživ protein skoraj vseh znanih rodov AM gliv in ga praktično najdemo v vseh tipih tal. Njegova koncentracija v tleh je lahko zelo različna in se giblje od 1 do 50 mg na g suhih tal (Maček, 2004), v nekaterih tropskih tleh lahko preseže vrednost 100 mg g⁻¹ tal (Rillig in sod, 2000a), v nekaterih pa ga je manj kot v drugih območjih. Glomalin predstavlja tudi do 25 % organske snovi v tleh (Maček, 2004). Poleg podnebja na AM glive, ki glomalin proizvajajo, vplivajo agrotehnični ukrepi, kot so intenzivnost obdelave tal, gnojenje, kolobar. Največ glomalina je v neobdelanih tleh. Bolj kot je obdelava intenzivna, manj je glomalina (Wright in Nicholas, 2002, cit. po Rojht, 2005). Wrightova je izmerila le 1,3 mg glomalina g⁻¹ tal v tleh z intenzivno obdelavo. Količina glomalina se je začela povečevati, ko so opustili obdelovanje.

V poskusu, ki so ga izvajali Rillig in sodelavci na travniških tleh (Rillig in sod., 2002), so dobljene vrednosti glomalina znašale od 1,3 do 1,6 mg g⁻¹ za lahko izločljivi glomalin in 4,7 do 5,2 mg g⁻¹ za skupni glomalin. Vrednosti izmerjenega glomalina v našem poskusu so bile podobne navedenim v primeru Bossoleta, ne pa tudi v primeru Stavešincev. Na poskusnem polju v Bossoletu so vrednosti skupnega glomalina nihale med 1,2 in 3,8 mg g⁻¹ tal. V Stavešincih pa so bile vrednosti skupnega glomalina kar trikrat manjše in so bile med 0,9 in 1,5 mg g⁻¹ tal. Vrednosti lahko izločljivega glomalina sta si med poskusnimi polji podobni, saj so pri obeh vrednosti porazdeljene med 0,24 in 0,42 mg g⁻¹. Na poskusnem polju v Stavešincih so bile meritve vsebnosti

glomalina v tleh enkrat že izvedene (Gajšek, 2006). Vrednosti skupnega glomalina, o katerih poročajo v teh raziskavah, so nekajkrat večje od naših in segajo vse do 8 mg g⁻¹ tal. Večje so tudi vrednosti lahko izločljivega glomalina, ki segajo od 1,0 do 2,2 mg g⁻¹ tal. Menimo, da je razlog, zakaj so vrednosti skupnega glomalina v našem poskusu tako majhne, treba iskati predvsem v vzorčenju tal za laboratorijsko analizo. Pri našem poskusu smo tla vzorčili tako, da smo postrgali površino tal v ovratniku, tako da smo zajeli le kakšen centimeter v globino. Ker je tik pod površjem mikoriza zelo malo prisotna, so vsebnosti glomalina temu primerno manjše.

Pri večini raziskav, ki preučujejo vpliv povečane koncentracije CO₂ na AM glive, se je pokazalo, da sta se odstotek koloniziranosti in frekvenca koloniziranosti korenin z AM glivami povečali pri povečani koncentraciji CO₂. Poznano je tudi, da se ob povečanju koreninske mase poveča tudi skupna biomasa AM gliv. Rezultati zaplinjevalnih poskusov kažejo, da se pri povečani koncentraciji poveča obseg zunaj koreninskega micelija in tudi koncentracija glomalina v tleh. To lahko razložimo z razlago, da se rastline odzovejo na povečano koncentracijo CO₂ in s spremenjenim delovanjem vplivajo na AM glive, s katerimi so v tesnem medsebojnem odnosu. Najbolj pogost odziv rastlin na povečano koncentracijo atmosferskega CO₂ je povečanje učinkovitosti izrabe vode in tudi fotosintezne kapacitete, če ni pomanjkanja hranil. Zaradi večje rasti rastlin se poveča biomasa korenin, ki lahko dajejo več asimilatov AM glivam, tako da se lahko količina AM micelija močno poveča. S tem proizvajajo AM glive več glomalina in delež ogljika v tleh se poveča.

Rillig in sod. (2000b) so na Novi Zelandiji izvajali poskus, kjer so na naravnem izviru CO₂ preučevali vpliv povečanega CO₂ na rastline in vnos ogljika v organsko snov. Meritve so izvajali tako, da so merili koncentracije atmosferskega CO₂ nad tlemi. Rezultati študije pokažejo, da se koloniziranost korenin, dolžine hif v tleh in vsebnost skupnega glomalina v tleh res povečujejo z večjimi koncentracijami CO₂. Ker so izmerjene vrednosti koncentracije CO₂ v zraku podobne tistim iz zaplinjevalnih poskusov in znašajo tudi do 600 ppm ni presenetljivo, da so rezultati podobni tistim iz zaplinjevalnih sistemov. Omeniti moramo, da ta poskus ni bil podoben našemu, saj so v omenjeni raziskavi koncentracije CO₂ merili le v zraku, o tistih v tleh in o tokih CO₂ iz tal pa ni podatkov. Predvidevamo, da so v našem poskusu pretoki CO₂ v tleh in koncentracija CO₂ v zraku mnogo večji in gre že za negativen vpliv CO₂ na rastline.

Rezultati vrednosti količine skupnega glomalina v Stavešincih pa ne kažejo, da bi povečan CO₂ vplival na odlaganje glomalina, saj se količina glomalina ne povečuje glede na povečanje pretoka CO₂. Vrednosti skupnega glomalina v Bossoletu se sicer linearno povečujejo z naraščanjem pretoka CO₂. Povečujejo se do pretoka 102 μmol m⁻² s⁻¹. Pri večjih vrednostih pretoka pa vsebnost glomalina pada, tako da je najmanjša vrednost glomalina izmerjena na ovratniku, kjer je bil pretok CO₂ največji. Podobno velja tudi za Stavešince, kjer je bila prav tako najmanjša vsebnost glomalina v tleh izmerjena na ovratniku z največjim pretokom CO₂. Menimo, da na linearno povečevanje vsebnosti glomalina v Bossoletu ne vplivajo dejavniki, razloženi v zgornji diskusiji, saj

se s povečevanjem pretoka CO₂ zmanjšuje rast rastlin. Pri največjih koncentracijah CO₂ v tleh je bila rast rastlin najbolj okrnjena, kar je dokaz, da tako visoke koncentracije negativno vplivajo na rastline in na AM glive, na kar kaže tudi najmanjša produkcija glomalina na teh mestih.

Poskus, izveden za diplomsko nalogo Martine Gajšek (2006), je bil podoben kot naš. Preučeval se je vpliv povečane koncentracije CO₂ na delovanje AM mikoize in na vsebnost glomalina v tleh v Stavešincih. Poskus Gajškove se je razlikoval od našega v tem, da so tam merili koncentracijo CO₂ v tleh na globini 20 cm, na površini 64 m². Poskusno polje so razdelili na pravilno vzorčno mrežo, s površino celice 1 m² in v vsaki posebej izvajali meritve koncentracije CO₂ v tleh ter pri vsaki vzeli vzorce tal za analizo koloniziranosti korenin in vsebnosti glomalina v tleh. Naš poskus pa je potekal na točno določenih lokacijah (ovratnikih), kjer smo merili tok CO₂ v tleh in tam vzorčili tla za analizo glomalina. Pri obeh diplomskih nalogah ni bilo moč najti povezave med geogenim CO₂ in koncentracijo glomalina. Menimo, da je vzrok temu omejeno delovanje mikroorganizmov v tleh, ki je posledica povečanih koncentracij CO₂ v tleh. Delovanje talnih mikroorganizmov je eden glavnih dejavnikov pri razgradnji zelo obstojne molekule glomalina. Ker je delovanje omejeno, razgradnja glomalina poteka bolj počasi. Menimo, da tudi v Bossoletu prihaja do kopičenja glomalina prav zaradi omejenega delovanja mikroorganizmov. Pri diplomski nalogi Gajškove je razvidno, da povečana koncentracija CO₂ ni pretirano vplivala na koloniziranost korenin z AM glivami. Zanimivo je to, da je bila prisotna v podobnem obsegu pri manjših in pri večjih koncentracijah CO₂. Temu primerno je tudi izenačena produkcija glomalina. Omeniti je še potrebno, da se koloniziranost ni bistveno spreminjala do neke meje, pri največjih vrednostih pretoka CO₂ je bila koloniziranost korenin z AM glivami in produkcija glomalina najmanjša. Podobno velja tudi za Bossoleto. Tu je koloniziranost korenin z AM glivami glede na različnost pretokov CO₂ ravno tako dokaj izenačena (Vodnik, ustno). Iz tega lahko sklepamo, da se produkcija glomalina ni bistveno razlikovala od posameznih lokacij. Menimo, da do razlik v vrednostih skupnega glomalina prihaja zato, ker se mikrobna aktivnost zmanjšuje pri povečevanju pretoka CO₂. To pomeni, da je pri večjih koncentracijah CO₂ v tleh delovanje mikroorganizmov tako omejeno, da proces razgradnje glomalina poteka zelo počasi. Predvidevamo tudi, da je proces razgradnje glomalina počasnejši od produkcije, na kar kažejo tudi manjše vrednosti glomalina, izmerjene na kontrolnih lokacijah, ki niso pod vplivom povečane koncentracije CO₂. Vsebnost skupnega glomalina na lokacijah s povečanim pretokom CO₂ v Stavešincih je bila prav tako večja od kontrolnih. Tu naj bi bila produkcija glomalina ravno tako hitrejša od razgradnje, zato prihaja do kopičenja. V primeru Stavešincev je zmanjšana mikrobna aktivnost na območju vrelcev CO₂ potrjena v doktorski disertaciji Irene Maček (2004).

5.2 SKLEPI

- Povečane koncentracije CO₂ na mofetah so tako velike, da negativno vplivajo na rast rastlin.
- Tok CO₂ iz tal je na osrednjem območju obeh proučevanih mofet podoben.
- Raziskava ni pokazala jasne povezave med talnim plinskim režimom na področju povečane koncentracije CO₂ (mofet) s količino glomalina v tleh.
- Sklepamo lahko, da CO₂ nima vpliva na sprotni vnos glomalina v tla, na kar kažejo podobne vrednosti lahko izločljivega glomalina (EEG) pri majhnem in večjem toku CO₂.
- Večje vrednosti skupnega glomalina smo določili pri večjih, ne pa tudi pri ekstremnem toku CO₂ v Bossoletu. To lahko razložimo z razlago, da pri večjem pretoku razgradnja glomalina poteka počasneje.
- Pri ekstremnih koncentracijah CO₂ znatno upade količina skupnega talnega glomalina, kar nakazuje, da je v takšnih razmerah delovanje AM gliv omejeno.

6. POVZETEK

Raziskava je potekala leta 2005 na dveh lokacijah z naravnim izviro CO₂. Prva mofeta (naravni izvir CO₂) se nahaja v SV Sloveniji v kraju Stavešinci, druga pa v Italiji, točneje v Toskani v Bossoletu. Poskusna polja se med seboj razlikujeta po svoji topografiji, pri prvem gre za ravninski svet, pri drugem pa za nekakšno udorno dolino, kjer so dnevno/nočne spremembe v koncentraciji atmosferskega CO₂ veliko bolj značilne. Namen naloge je bil preučiti vpliv povečane koncentracije CO₂ na količino glomalina v tleh. Glomalin je glikoprotein, katerega naj bi izločale AM glive, v tleh pa je zelo obstojen in ima pomembno vlogo pri tvorbi strukturnih agregatov v tleh. Tok CO₂ v tleh smo merili z aparatom za merjenje dihanja tal Li-6800 (Licor, ZDA). Meritve smo izvajali na mestih z majhnim, srednjim in velikim tokom CO₂. V Stavešincih so meritve toka potekale od junija do novembra 2005, v Bossoletu pa je bil tok CO₂ izmerjen le maja 2005. Izmerjene vrednosti toka se niso bistveno razlikovale med lokacijama, pri obeh so bile minimalne vrednosti okoli 8 μmol m⁻² s⁻¹ in maksimalne nekaj čez 200 μmol m⁻² s⁻¹. Povprečje tokov CO₂ v tleh. Povprečne vrednosti toka CO₂ v tleh, brez kontrolnih lokacij, so si na obeh lokacijah enake in znašajo 80 μmol m⁻² s⁻¹.

Vzorci tal za analizo količine glomalina so bili zbrani na mestih, kjer smo izvajali meritve toka CO₂. Opravili smo ekstrakcijo lahko izločljivega glomalina in ekstrakcijo skupnega glomalina. Količino glomalina v tleh smo določili z Bradfordovim testom.

Raziskava je pokazala, da ni jasne povezave med povečanim tokom CO₂ iz tal in količino glomalina v tleh. Na to kažejo izenačene vrednosti lahko izločljivega glomalina pri obeh lokacijah. Vrednosti EEG se bistveno ne spreminjajo s povečanjem toka CO₂, kar kaže na to, da sprotna produkcija in vnos glomalina nista motena zaradi povečane koncentracije CO₂ v tleh. Povečane koncentracije skupnega glomalina smo našli v Bossoletu pri večjih, ne pa tudi pri ekstremnih vrednostih toka CO₂. Menimo, da je razlog temu zmanjšana razgradnja glomalina v tleh zaradi občutljivosti talnih mikroorganizmov na povečane koncentracije CO₂ v tleh. V Stavešincih povečanja skupnega glomalina v razmerah velikih talnih fluksov CO₂ nismo opazili.

7. VIRI

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254
- Brady N.C., Weil R.R. 2002. *The nature and properties of soils*. 13th edition. Upper Saddle River, Prentice Hall 960 str.
- Earth observatory. NASA. 2006–12–0
http://earthobservatory.nasa.gov/Library/CarbonCycle/carbon_cycle4.html (16.11.06)
- Flanagan L.B., Johnsim B.G. 2005. Interacting effects of temperature, soil moisture and plant biomass production on ecosystem respiration in a northern temperate grassland. *Agricultural and Forest Meteorology*, 130 (3–4): 237–253
- Gajšek M., 2006. Vpliv naravno povečane koncentracije CO₂ na arbuskularno mikorizo. Univerzitetno diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 46 str.
- Gadkar V., Rillig M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbial Letters*, 263: 93-101
- van Gardinger P.R., Grace J., Jeffree C.E., Byari S.H., Miglietta F., Raschi A., Bettarini I. 1997. Long-term effects of enhanced CO₂ concentrations on leaf gas exchange: research opportunities using CO₂ springs. V: *Plant responses to elevated CO₂*. Raschi A., Miglietta R., Tognetti R. Cambridge: 69–86
- Godbold D.L., Hoosbeek M.R., Lukac M., Cotrufo F.M., Janssens I.A., Ceulemans R., Polle A., Velthorst E.J., Scarasia-Mugnozza G., De Angelis P., Miglietta F., Peressotti A. 2006. Mycorrhizal hyphal turnover as dominant process for carbon input into soil organic matter. *Plant and Soil*, 281: 15–24
- Jones M.B., Donnelly A. 2004. Carbon sequestration in temperate grassland ecosystems and the influence of management, climate and elevated CO₂. *New Phytologist*, 164: 423–439
- Lovelock C.E., Wright S.F., Clark D.A., Ruess R.W. 2004. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, 92: 278–287
- Maček I. 2004. Odziv korenin izbranih kmetijsko pomembnih vrst na naravno povečano koncentracijo CO₂. Doktorska disertacija. Ljubljana. Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo: 105 str.

- Maček I., Vodnik D. 2005. Glomalin, protein arbuskularnih mikoriznih gliv. Lepilo strukturnih agregatov in pomembna komponenta organske snovi tal. *Proteus*, 67: 244–251
- Maestre F.T., Cortina J. 2003. Small-scale spatial variation in soil CO₂ efflux in a Mediterranean semiarid steppe. *Applied Soil Ecology*, 23: 199–209
- Pfanz H., Vodnik D., Wittmann C., Aschan G., Raschi A. 2004. Plants and Geothermal CO₂ Exhalations - Survival in and Adaptation to the high CO₂ Environment. *Progress in Botany*, 65: 449–537
- Raich J.W., Schlesinger W.H. 1992. The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus*, 44B: 81–99
- Rillig C., Wright S. F., Kimball B.A., Pinter P.J., Wall G.W., Ottman M.J., Leavitt S.W. 2001a. Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a *Sorghum* field; a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Global Change Biology*, 7: 333–337.
- Rillig C. Matthias, Wright Sara F., Nichols Kristine A., Schmidt Walter F., Torn Margaret S. 2000a. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*, 233: 161–177.
- Rillig M.C., Hernandez G.Y. Newton P.C.D. 2000b. Arbuscular mycorrhizae respond to elevated atmospheric CO₂ after long-term exposure: evidence from CO₂ spring in New Zealand supports the resource balance model. *Ecology Letters*, 3: 475–478
- Rillig M.C., Wright S.F., Eviner V.T. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil*, 238: 325–333
- Rillig C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84: 355–363
- Rojht H. 2005. Mikorizni status koruze v razmerah naravno povečane koncentracije CO₂. Diplomsko delo. Ljubljana. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo: 39 str.
- Rosier, C.L., Hoyer, A.T., Rillig, M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology & Biochemistry*, 38 (8): 2205–2211
- Smith S.E., Read D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second Edition. London, Academic Press: 605 str.

- Tuba Z., Raschi A., Lanini G. M., Nagy Z., Helyes L., Vodnik D., Sanità di Toppi L. 2003. Plants response to elevated carbon dioxide. V: Sanità di Toppi L., Pawlik-Skawrońska B. (eds.). *Abiotic Stress in Plants*. 2003. Kluwer Academic Publishers: 157–204
- Vodnik D., Maček I., Pfanž H., Kastelec D., Stopar D. 2004. Small-scale variability of soil CO₂ and soil respiration at the mofette Stavenšinci (NE Slovenia). V: *Partitioning soil CO₂ efflux : joint workshop : Capri, Italy Oct 2nd - 4th 2004 : Carboeurope/COST Action 627*: 32
- Vodnik D., Kastelec D., Pfanž H., Maček I., Turk B. 2006. Small-scale spatial variation in soil CO₂ concentration in a natural carbon dioxide spring and some related plant responses. *Geoderma*, 133: 309–319.
- Wang W., Ohse K., Liu J.J, Mo W.H., Oikawa T. 2005. Contribution of root respiration to soil respiration in a C-3/C-4 mixed grassland. *Journal of Biosciences*, 30 (4): 507–514
- Wright S.F., Upadhyaya A.. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 9: 575–586.
- Wright S.F., Upadhyaya A.A. 1998. Survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198, str: 97–107
- Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F. 2006. Comparison of efficacy of three extractants to solubilize glomalin on hyphae and soil. *Chemosphere*, 64: 1219–1224

ZAHVALA

Najprej se za vso pomoč, vodenje pri izdelavi naloge in dragocene nasvete iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Dominiku VODNIKU.

Zahvaljujem se tudi Marjanci Jamnik za pomoč v laboratoriju in Urški Videmšek za pomoč pri obdelavi podatkov.

Navsezadnje se najlepše zahvaljujem očetu Bojanu in mami Vidi, ki sta me bodrila in podpirala skozi vsa obdobja šolanja ter seveda moji dragi Meti za vso potrpežljivost, vzspodbudo in razumevanje.

Hvala vsem!