

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Helena ROJHT

**MIKORIZNI STATUS KORUZE (*Zea mays* L.) V
RAZMERAH NARAVNO POVEČANE
KONCENTRACIJE CO₂**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2005

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Helena ROJHT

**MIKORIZNI STATUS KORUZE (*Zea mays* L.) V RAZMERAH
NARAVNO POVEČANE KONCENTRACIJE CO₂**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MYCORRHIZAL STATUS OF MAIZE (*Zea mays* L.) UNDER
NATURAL CO₂ ENRICHMENT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2005

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na poskusnem polju koruze v Stavešincih 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 in za somentorico as. dr. Ireno MAČEK.

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

Član: doc. dr. Ludvik ROZMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Helena ROJHT

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Dn	Dn
DK	UDK 633.15:581.13:631.433.53:631.466.12(043.2)
KG	koruza/ <i>Zea mays</i> /arbuskularno mikorizne glive/glomalin/naravni izviri CO ₂
KK	AGRIS F60
AV	ROJHT, Helena
SA	VODNIK, Dominik (mentor), MAČEK, Irena (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2005
IN	MIKORIZNI STATUS KORUZE (<i>Zea mays</i> L.) V RAZMERAH NARAVNO POVEČANE KONCENTRACIJE CO ₂
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 39, [4] str., 3 preg., 14 sl., 3 pril., 39 vir
IJ	sl
JJ	sl / en
AI	V letu 2002 smo proučevali koruzo (<i>Zea mays</i> L.), ki je rasla na polju z vreleci geogenega CO₂ (Stavešinci, Slovenija). Poskus je bil zastavljen na površini 153 m² (9 x 17 m), kjer smo ob žetvi vrednotili rastne parametre in merili talno koncentracijo CO₂ (153 kvadratov, velikih 1 m²). Rastni parametri so bili obratno sorazmerni s talno koncentracijo CO₂. Od posameznih rastlin iz dveh 15 m² velikih parcel, ki sta predstavljali ekstrema v talni koncentraciji CO₂ (velik CO₂ in majhen CO₂), smo odvzeli vzorce za proučevanje mikorizne kolonizacije. Za analize glomalina smo odvzeli tla iz rizosfere istih korenin rastlin. Rezultati interseksijske metode so pokazali, da je kolonizacija korenin z arbuskularnimi mikoriznimi glivami pri obeh skupinah rastlin podobna, zato sklepamo, da povečan CO₂ nima vpliva na obseg simbioze. Pri količini glomalina pa smo ugotovili, da sta količini lahko izločljivega in skupnega glomalina nekoliko večji v tleh s povečano koncentracijo CO₂. Domnevamo, da je ta razlika v količini posledica počasnejše razgradnje glomalina v tleh s povečano koncentracijo CO₂.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 633.15:581.13:631.433.53:631.466.12(043.2)

CX maize/*Zea mays*/arbuscular mycorrhizal fungi/glomalin/natural CO₂ spring

CC AGRIS F60

AU ROJHT, Helena

AA VODNIK, Dominik (supervisor), MAČEK, Irena (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2005

TI MYCORRHIZAL STATUS OF MAIZE (*Zea mays* L.) UNDER NATURAL ELEVATED CO₂

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 39, [4] p., 3 tab., 14 fig., 3 ann., 39 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In the year 2002 maize plants (*Zea mays* L.) were grown in a field influenced by a geogenic CO₂ (CO₂ spring Stavešinci, Slovenia). Our research was focused on the area of 153 m² (9 x 17m) where detailed measurements of growth parameters and soil CO₂ concentration were made at the time of harvest (sampling grid with 1 m resolution, 153 units). Growth parameters were negatively correlated with the soil CO₂ concentration. From the two subplots, that differed in CO₂ enrichment (high CO₂, normal CO₂, each of 15m² size) individual maize plants were sampled for the evaluation of mycorrhizal colonization. In addition, soil from the rhizosphere of the same plants was sampled for glomalin analyses. Line intersection estimation of AM revealed similar colonization in both groups of plants and it is to conclude that elevated CO₂ has no effect on the extent of symbiosis. On the other hand the content of easy extractable and total glomalin was slightly higher in the case of CO₂ enriched plants. It is to presume that this difference could result from a slower degradation of glomalin in CO₂ rich soil.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XII
1 UVOD	1
1.2 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKORIZA	3
2.1.1 Arbuskularna mikoriza (AM)	3
2.1.2 Glomalin	4
2.1.3 Mikoriza pri koruzi	6
2.1.3.1 Vplivi arbuskularnih mikoriznih gliv na koruzo	6
2.1.3.2 Vpliv agrotehničnih ukrepov na arbuskularne mikorizne glive	7
2.1.3.3 Propaguli arbuskularnih mikoriznih gliv	7
2.2 POVEČANA KONCENTRACIJA CO ₂	8
2.2.1 Rastline in povečana koncentracija CO ₂	8
2.2.2 Koruza (<i>Zea mays</i> L.) in povečana koncentracija CO ₂	8
2.3 MIKORIZA IN POVEČANA KONCENTRACIJA CO ₂	9
2.4 NARAVNI IZVIRI CO ₂	11
2.4.1 Učinki naravno povečane koncentracije CO ₂ na rastline	12
2.4.2 Naravno povečana koncentracija CO ₂ in arbuskularne mikorizne glive	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 IZVIRI CO ₂ V STAVEŠINCIH	14
3.2 OPIS POSKUSA	15
3.3 VZORČENJE NA TERENU	15
3.4 MERJENJE TALNE KONCENTRACIJE CO ₂	16
3.5 LABORATORIJSKO DELO	17
3.5.1 Barvanje s tripan modrim	18

3.5.2	Interseksijska metoda določevanja kolonizacije pri arbuskularni mikorizi	18
2.5.2.1	Ocenjevanje kolonizacije pri arbuskularni mikorizi	20
3.5.3	Ekstrakcija glomalina (po Wright in sod., 1996, Wright in Upadhyaya, 1996, Wright in Upadhyaya, 1998)	20
3.5.3.1	Ekstrakcija lahko izločljivega glomalina EEG (easily extractable glomalin)	20
3.5.3.2	Ekstrakcija skupnega glomalina TG (total glomalin)	20
3.5.3.3	Analiza proteinov (Bradfordov test)	21
3.5.3.4	Izračun količine glomalina	22
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	22
4	REZULTATI	23
4.1	MERITVE TALNE KONCENTRACIJE CO ₂	23
4.2	RAST KORUZE	24
4.3	KOLONIZIRANOST KORENIN KORUZE Z ARBUSKULARNIMI MIKORIZNIMI GLIVAMI	26
4.4	IZRAČUNI KONCENTRACIJE GLOMALINA	28
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	30
5.1	RAZPRAVA	30
5.1.1	Vpliv povečane talne koncentracije CO₂ na koloniziranost korenin koruze z arbuskularnimi mikoriznimi glivami	30
5.1.2	Vpliv povečane talne [CO₂] na količino glomalina v tleh	32
5.2.3	Metodološke izboljšave	33
5.2	SKLEPI	35
6	POVZETEK	36
7	VIRI	38
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str:
Preglednica 1: Povprečje, najmanjša in največja vrednost koncentracije talnega CO ₂ (%) in povprečje, najmanjša in največja višina rastlin (cm) pri povečani in pri majhni talni koncentraciji CO ₂ .	25
Preglednica 2: Parametri za maso storžev, maso zelinja in višino rastlin. Analiza je bila narejena v letu 2002. Prikazani so povprečje, najmanjša in največja vrednost posameznih rastnih parametrov.	25
Preglednica 3: Povprečna količina lahko izločljivega (EEG) in skupnega (TG) glomalina (mg/g tal), njune standardne napake (SE), največje in najmanjše vrednosti (mg/g tal) pri povečani (»V«) in majhni (»N«) talni koncentraciji CO ₂ .	28

KAZALO SLIK

	str:
Slika 1: Strukture arbuskularno mikoriznih gliv v posameznih plasteh korenin (Csiro..., 2005).	4
Slika 2: Glomalin dobljen po izolaciji iz tal (Foto: D. Vodnik).	5
Slika 3: Povezanost dejavnikov, ki vplivajo na arbuskularne mikorizne glive.	9
Slika 4: Večji vrelec CO ₂ v gozdu v kraju Stavešinski vrh, neposredno ob Stavešincih (levo) in razpadajoče truplo manjšega ptiča tik ob vrelec (desno).	12
Slika 5: Parcela, na kateri je bilo 2002 leta poskusno polje koruze, je označena s črnim okvirjem. Na predelih rjave barve, označenih s puščico, so mofete.	14
Slika 6: Shema poskusa. S puščicami sta označeni palici, s pomočjo katerih smo naredili mrežo z 1 m ² kvadrati (v nadaljevanju parcelice). Iz vsake parcelice posebej smo vrednotili rastne parametre rastlin.	15
Slika 7: Prenosni analizator plinov GA 2000 s talno sondo (Foto: D. Vodnik).	16
Slika 8: Intersekcijaska metoda. V smereh puščic se štejejo vsi horizontalni in vertikalni preseki korenin na poudarjenih črtah. Preseke korenin v posamezni liniji, ki so kolonizirani z AMG zapisujemo pod oznako »AM«, vse preseke pa pod oznako »TOT«. Barvilo tripan modro je obarvalo AM strukture temno modro, ostale nekolonizirane korenine pa svetlo modro.	19
Slika 9: Izmerjene koncentracije talnega CO ₂ v %, iz katerih se lepo vidijo velika odstopanja v koncentracijah talnega CO ₂ med sosednjimi parcelicami. Vsak kvadrataček predstavlja eno meritev in 1 m ² . Iz obeh obrobjenih okvirjev velikosti 15 m ² so bili odvzeti vzorci za analizi koloniziranosti korenin z arbuskularnimi mikoriznimi glivami ter za količino glomalina v rizosferi. Levi okvir predstavlja območje s povečano (večjo) talno koncentracijo CO ₂ , zato je označen s črko »V«, levi pa predstavlja majhno oz. nizko talno koncentracijo CO ₂ in smo ga označili s črko »N«.	23
Slika 10: Suha masa zelinja koruze na poskusni njivi v Stavešincih, ob žetvi septembra 2002. Vsak kvadrataček predstavlja povprečno suho maso zelinja vseh rastlin na površini 1 m ² . Okvirja predstavljata ploskvi iz katerih so bile odvzete rastline za opravljanje analize koloniziranosti korenin z arbuskularnimi mikoriznimi glivami ter za analizo količine glomalina v rizosferi.	24

Slika 11:	Z AM glivami kolonizirana korenina koroze. Na sliki je vidno vstopno mesto hife glive v korenino rastline (apresorij je označen s puščico). Temnejši predeli znotraj celic so arbuskuli (Foto: I. Maček).	26
Slika 12:	Povprečna koloniziranost korenin (%) pri majhni in povečani talni koncentraciji CO ₂ .	27
Slika 13:	Količina lahko izločljivega (EEG) in skupnega (TG) glomalina (mg/g tal) pri majhni in povečani talni koncentraciji CO ₂ s standardnimi napakami.	28
Slika 14:	AM koloniziranost korenin koroze pri povečani in majhni koncentraciji CO ₂ s standardnimi odkloni (levo) in primerjava (desno) za oba ocenjevalca.	32

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Obrazec za ocenjevanje kolonizacije korenin z AMG po intersekcijski metodi.
- Priloga B: Izračuni za koloniziranost korenin koruze (%), njihova povprečna vrednost (%) in standardni odklon pri majhni in povečani talni koncentraciji CO₂ za oba ocenjevalca.
- Priloga C: Količine lahko izločljivega glomalina (EEG) in skupnega glomalina (TG) v mg/g tal ter njune povprečne vrednosti.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMG- AM gliva	arbuskularna mikorizna gliva
BSA	bovine serum albumin - goveji serumski albumin
C ₃ rastline	rastline s C ₃ fotosintetskim metabolizmom
C ₄ rastline	rastline s C ₄ fotosintetskim metabolizmom
CAM	kisli metabolizem sočnic
[CO ₂]	koncentracija ogljikovega dioksida
EEG	easily extractable glomalin - lahko izločljivi glomalin
IR svetloba	infrardeča svetloba
IRGA detektor	infra red gas analyser - infrardeči plinski analizator
PBS	phosphate buffered saline - pufer PBS
pH	-log [H ₃ O ⁺]; oznaka za kislost oz. bazičnost; merilo za koncentracijo hidronijevih/vodikovih ionov v raztopini
ppm	part per milion - milijonti del
rpm	rotation per minute - vrtljajev na minuto
TG	total glomalin - skupni glomalin, ki ga lahko izločimo iz tal
v/v	volumski delež
WUE	water use efficiency - učinkovitost izrabe vode

SLOVARČEK

Arbuskul	fino, drevesasto razvejane hife znotraj celic koreninske skorje gostitelja
Fitoremediacija	uporaba rastlin za <i>in situ</i> čiščenje z anorganskimi ali organskimi onesnažili onesnaženih tal in voda
Ekstraradikalni micelij	zunaj koreninski micelij (micelij v tleh)
Hipoksija	pomanjkanje kisika v tleh
Intracelularne hife	hife gliv, ki so v celicah korteksa korenin
Intercelularne hife	hife gliv, ki so v skorji rastlinske korenine med celicami
Korteks	koreninska skorja
Mofeta	talni vrelec ogljikovega dioksida
Propaguli	spore ali hife gliv ali koščki koloniziranih korenin rastlin, v bistvu vsak del oz. ostanek glive, ki se je sposoben razviti v novo, samostojno glivo, enoto
Vezikel	jajčasta, okrogla struktura v ali med celicami korenin višjih rastlin, ki ima založno nalogo

1 UVOD

Že dalj časa je znano dejstvo, da se koncentracija okoljskega oz. atmosferskega ogljikovega dioksida (CO₂) v svetovnem merilu povečuje. Največja proizvajalca CO₂ sta industrija in promet z rabo fosilnih goriv, kot začetek naraščanja koncentracije CO₂ pa smatramo začetek industrijske revolucije v 18. stoletju. V kmetijstvu se je povečalo sproščanje CO₂ predvsem zaradi spremenjene rabe tal, veliko CO₂ nastaja npr. pri prehitri mineralizaciji humusa. Na začetku 19. stoletja je koncentracija atmosferskega CO₂ znašala približno 290 ppm, danes je že dosegla mejo 360 ppm in še vedno narašča, približno 1,8 ppm na leto. Ob takem napredovanju se bo koncentracija do leta 2010 podvojila. Zaradi večanja CO₂ se spreminja tudi delež ogljika v zemeljski biomasi in v oceanih (Rillig in sod., 2002).

Najvažnejši učinki povečanja CO₂ na rastline so povezani z dejstvom, da je CO₂ substrat za fotosintezo. Pri rastlinah, ki so pod vplivom povečane koncentracije CO₂¹, opažajo večjo učinkovitost izrabe vode, večjo fotosintezo, kar posledično vodi do večje rasti in večjega kopičenja zemeljskega ogljika v tleh (Rillig in sod., 2002).

Poleg direktnega učinka, pa lahko globalno povečanje CO₂ na rastline deluje tudi posredno. CO₂ je poleg CH₄, N₂O in klorovodikov, toplogredni plin, ki povzroča globalno segrevanje - tako imenovani učinek tople grede. Povečana temperatura ima lahko vpliv tako na nadzemne kot tudi na podzemne dele rastlin. To pomeni, da vpliva tako na poganjke rastlin kot na njene korenine. Korenine rastlin so velikokrat gostiteljice simbiotskih, arbuskularnih mikoriznih (AM gliv ali AMG) gliv. Učinek povečane temperature na AM glive, ki so prisotne na koreninah še ni čisto jasen, je pa vsekakor odvisen od učinka, ki ga ima povišana temperatura na rastlinskega partnerja in na simbiotsko povezavo rastlina-AM gliva (Rillig in sod., 2002).

Raziskave, ki v zadnjem času intenzivno potekajo so predvsem kratkotrajni zaplinjevalni poskusi v kontroliranih prostorih, kjer merijo več rastnih parametrov. Prav tako so začeli raziskovati obnašanje vegetacije na naravnih virih CO₂. Obema nivojema raziskav je skupno, da so procesi v tleh slabše poznani, kot odziv procesov v nadzemnem delu rastline.

1.2 CILJI IN HIPOTEZE DIPLOMSKEGA DELA

V zadnjem času so raziskovalci začeli aktivno proučevati povečano koncentracijo CO₂ ob naravnih talnih izvirih. Cilj te diplomske naloge je ugotoviti, kako vpliva povečana koncentracija talnega CO₂ ob mofetah (vrelcih CO₂) na koloniziranost korenin koruze z arbuskularnimi mikoriznimi glivami. Ugotavljali bomo, kako vpliva talni CO₂ na odstotek koloniziranih korenin koruze. Prav tako bomo analizirali vsebnost glomalina - glikoproteina, ki ga AM glive izločajo v tla - v vzorcih tal z normalno in povečano talno koncentracijo CO₂. Ker je ta glikoprotein dobro obstojen tudi več deset let, nam predstavlja podatek o prisotnosti gliv v daljšem obdobju.

¹ V nadaljevanju uporabljamo tudi izraz »povečan CO₂« v smislu povečana koncentracija CO₂

Močno povečana atmosferska koncentracija CO₂ na naravnih izvirih deluje zaviralno na rastline. Predvidevamo, da bo podobno, torej zaviralno, delovala tudi povečana talna koncentracija CO₂. Zaradi neposredne odvisnosti mikorize od fiziološkega stanja gostiteljske rastline predvidevamo, da se bo negativen vpliv prenesel na arbuskularne mikorizne glive. Pri koruzi, ki raste na območjih z močno povečano koncentracijo CO₂ pričakujemo slabo rast in manjšo koloniziranost korenin z arbuskularnimi mikoriznimi glivami. Posledično pričakujemo v tleh s povečano koncentracijo CO₂ tudi manj glomalina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKORIZA

Mikoriza je pojem, ki označuje sožitje med višjimi rastlinami in med AM 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, vendar ne prodre do centralnega cilindra, endodermisa in meristema korenine, temveč inificira le celice v njenem korteksu (koreninski skorji). Hife gliv pri endotrofni mikorizi naseljujejo po večini le najmlajše in najtanjše koreninice. V substratu se razraščajo dlje kot rastlinske korenine, večajo 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 čimveč različnih vrst in sevov arbuskularnih mikoriznih gliv (Maček, 2004; Smith in Read, 1997).

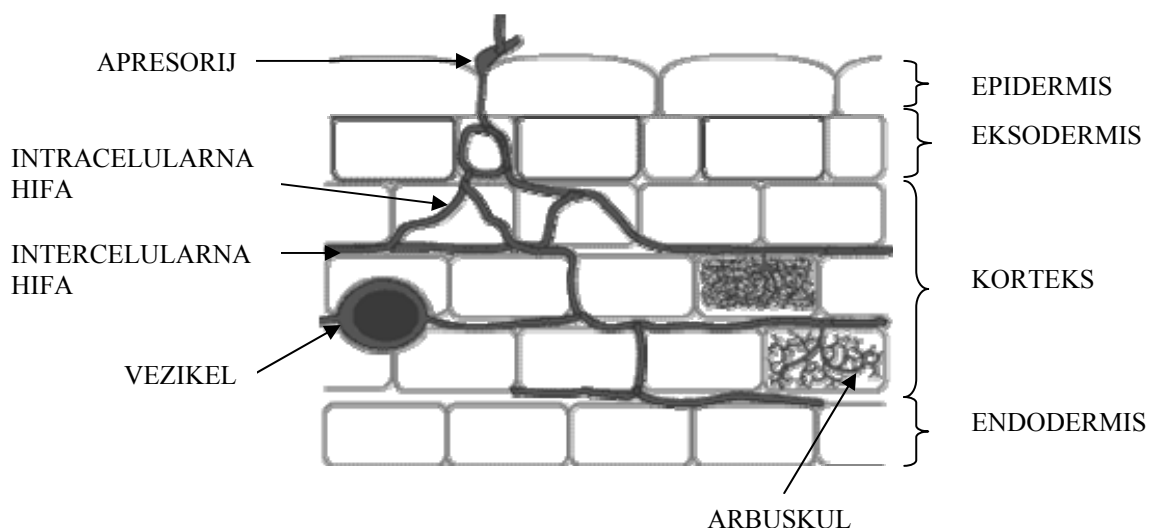
2.1.1 Arbuskularna mikoriza (AM)

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). Ime izhaja iz arbuskula, ene izmed struktur, ki jo tvorijo arbuskularne mikorizne glive.

AM glive so neseptirane nižje glive, obligatni (obvezni) simbionti in nimajo saprofitskih sposobnosti, zato jih ne moremo gojiti brez gostiteljskih rastlin (Slika 3). 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*.

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 vejanje hif AM gliv stimulirajo izločki gostiteljskih korenin (1). Hife tvorijo na površini korenine apresorije, preko katerih začno mehansko (delno tudi s hidrolitičnimi encimi) prodirati v epidermalne (epidermis) celice korenin (2). Od tam se širijo v 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 4-15 dni. Še zdaj ni razjasnjeno ali je propadanje arbuskulov avtolitično ali pa gre za litične procese gostitelja. (4,5) V koreninski skorji (korteksu) tvori hifa še eno strukturo, značilno za AM glive, to je vezikel. Vezikli so terminalne ali interkalarne odebelitve, vsebujejo veliko lipidov v obliki kapljic, zato imajo založno funkcijo. (5) Ko AM gliva prodre v korenino, se začne rast zunajkoreninskega (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).



Slika 1: Strukture arbuskularno mikoriznih gliv v posameznih plasteh korenin (Csiro..., 2005).

2.1.2 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. 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 natančno 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 30 do 40 % ogljika. Nase ima lahko močno vezane ione železa (9 % mase proteina) in druge ione (Maček in Vodnik, 2005).



Slika 2: Glomalin dobljen po izolaciji iz tal (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 pritrjal 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, 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 danes poznanimi ekstrakcijskimi postopki (več ponavljajočih se ciklov) izločimo iz tal (Wright in Upadhyaya, 1998) in (3) rezidualni glomalin, ki ga z dosedaj poznanimi postopki še ne moremo ekstrahirati iz tal (Lovelock in sod., 2004, cit. po Maček 2004; Nichols 2003, cit. po Maček, 2004).

2.1.3 Mikoriza pri koruzi

2.1.3.1 Vplivi arbuskularnih mikoriznih gliv na koruzo

Koruzo je zelo dobra gostiteljica AM gliv in bolje uspeva ob njihovi prisotnosti. Kot je znano, imajo AMG veliko pozitivnih učinkov na gostitelje in koruzo ni izjema. Mikoriza na koruzi je zelo dobro proučena in večina raziskav je pokazala pozitiven vpliv AMG.

Ena izmed najpomembnejših vlog mikoriznih gliv je, da večajo prehranjenost rastlin s hranili in večajo privzem vode. Njihova najpomembnejša vloga je črpanje in posredovanje fosforja (P), ki je velikokrat v taki obliki, ki je rastlinam nedostopna. Vendar je od založenosti tal s fosforjem odvisno, koliko gliv bo prisotnih. Fries in sod. (1998), Rawat in sod. (1996) in Braunberger in sod. (1991) so prišli do ugotovitve, da se z večanjem količine fosforja v tleh zmanjšuje koloniziranost korenin koruze in s tem se pozitiven učinek na koruzo zmanjšuje. Poleg fosforja je pomemben element cink (Zn), ki ga AMG uspešno posredujejo koruzi (Kothari in sod., 1991), prav tako tudi naslednje elemente: dušik (v obliki NH⁴⁺), kalij (K), kalcij (Ca), fosfat (SO₄²⁻), baker (Cu) (Marschner in Dell., 1994). Z večjo absorpcijsko površino, sprejmejo hife gliv tudi več vode in pri stresnih situacijah, kot je pomanjkanje vode, blažijo posledice vodnega stresa in tudi sicer, ob normalnih rastnih razmerah dajejo rastlini večje količine vode, hranil kar se kaže v boljši rasti koruze. Amerian (2001) je ugotovil, da se rastni parametri pri koruzi, kot so: stomatalna prevodnost listnih rež, fotosinteza in vodni potencial v listih, ob sušnem stresu počasneje manjšajo kot pri nemikoriznih rastlinah. Prav tako AMG pri kultivarjih koruze, ki so bolj občutljivi na sušo, izboljšujejo toleranco na vodni stres (Subramanian in sod., 1995).

Ob večjem privzemu hranil, ki jih gostitelj potrebuje, AMG tudi ščitijo rastline koruze pred presežkom posameznih elementov v tleh in raznimi polutanti, predvsem težkimi kovinami kot so svinec (Pb), cink (Zn), kadmij (Cd), baker (Cu). Lahko pa AMG delujejo nasprotno, lahko ob optimalnih razmerah pri ustaljeni kmetijski praksi, večajo absorpcijo težkih kovin iz kontaminiranih tal (Weissenhorn in sod., 1995). Rezultati raziskave, ki jo je opravil Weissenhorn s sodelavci (1995) so pokazali, da je privzem težkih kovin odvisen od rastnih razmer, od vrste AMG in od težke kovine v tleh, zato je vpliv AMG na privzem težkih kovin nemogoče splošiti. Možna je uporaba določenih vrst AMG za fitoremediacijo, npr. v tleh okuženih s cinkom, saj imajo hife nekaterih gliv, ki kolonizirajo korenine koruze, zelo veliko afiniteto do tega elementa (Chen, 2001). Na območjih rudnikov premoga na Kitajskem so AMG (rod *Glomus*) premestile manj natrija v poganjke in tako morda ščitile koruzo pred prekomernim kopičenjem tega elementa, hkrati pa izboljšale privzem drugih hranil ter tako povečale pridelek (Bi in sod., 2003).

Razpon rastišč, kjer raste koruzo je zelo velik, prav tako je s tipi tal, ki imajo različne lastnosti, med drugim pH vrednost, od katere je odvisen privzem hranil. Kot kažejo raziskave, so AM glive pogosto prilagojene na več talnih okolij, na kislja in bazična tla in

normalno delujejo ob spremembi pH tal, kar pomeni, da nemoteno črpajo in bolje zalagajo koruso s hranili (P, N, Zn in Cu,) kot se sama (Clark in Zeto, 1996).

2.1.3.2 Vpliv agrotehničnih ukrepov na arbuskularne mikorizne glive

Kako bo simbioza med koruso in AMG uspešna pa je odvisno od agrotehničnih ukrepov, ki poleg drugih dejavnikov, ključno uravnavajo delovanje mikorize (Slika 3). Velik vpliv na AM kolonizacijo ima kolobar. Gavito in Miller (1998) sta ugotovila, da ima na zgodnjo intraradikalno kolonizacijo korenin koruze največji vpliv predposevek, manj način obdelave tal in gnojenje. Če predposevek ni gostiteljska rastlina AMG (v tej raziskavi *Brassica napus* L.), je kolonizacija manjša in obratno. Na količino AM hif gliv in na koncentracijo nekaterih elementov (P, Zn in Cu) v tkivih koruze vpliva tudi obdelava tal. Manj kot so obdelana (brez oranja), več je hif gliv (Kabir in sod., 1998). Intenzivnost obdelave tal vpliva tudi na vrstno sestavo združb AMG (Jansa in sod., 2003), to pomeni, da se z načinom obdelave tal spreminja delež posameznih vrst AM gliv.

2.1.3.3 Propaguli arbuskularnih mikoriznih gliv

Prav zaradi vseh zgoraj naštetih pozitivnih učinkov, se vedno bolj razvijajo tehnike, s katerimi namnožujejo AMG propagule. To so deli mikoriznih gliv, ki lahko prispevajo h kolonizaciji novih korenin, oz. korenin novih rastlin, mednje pa prištevamo mikorizne spore, hife gliv in koščke koloniziranih korenin rastlin. Ker je korusa dobra gostiteljica mikoriznih gliv, se uporablja za razmnoževanje propagulov (Gaur in Adholeya, 2000; Talukdar in Germida, 1993). Na ta način se lahko pripravi AM inokulum, ki vsebuje propagule in s katerim lahko uspešno mikoriziramo koruso ali druge rastlinske vrste. V praksi inokulirajo vse več rastlinskih vrst npr. drevesa, okrasne rastline, opravljajo pa tudi poskuse na agronomskih vrstah. Opravljenih je bilo tudi več poskusov, pri katerih so primerjali različne rastne parametre neinokuliranih in inokuliranih rastlin koruze. Khaliq in Sanders (1997) sta ugotovila pozitiven učinek inokulacije rastlin na privzem fosforja v zgodnjih fazah razvoja koruze. Danes je raba AM inokulumov dokaj razširjena, komercialno dostopna, postopki za pridobivanje propagulov za boljšo rast vrtnih rastlin pa so dostopni širši javnosti na več spletnih straneh. Ker je torej pridobivanje propagulov precej enostavna metoda, Douds s sod. (2005) predlaga pridobivanje AM inokuluma za uporabo na kulturnih rastlinah kar na samih kmetijah.

2.2 POVEČANA KONCENTRACIJA CO₂

2.2.1 Rastline in povečana koncentracija CO₂

Kako rastlina reagira na spremembo koncentracije CO₂, je odvisno od posamezne rastlinske vrste in od tipa fotosintetskega sistema, ki ga rastlina ima (C₃, CAM in C₄ rastline). Zato povečan CO₂ med drugim vpliva na kompetitivnost različnih vrst rastlin in posledično na vrstno sestavo združbe. Kot posredni vpliv povečanega CO₂ smatramo globalno segrevanje, preko katerega se spreminjajo rastni parametri rastlin. Neposredno povečan atmosferski CO₂ vpliva na nadzemne dele rastline, preko njih pa tudi na korenine in mikorizne glive. Na rastlinah lahko povzroča fiziološke spremembe, kot so manjša transpiracija, izboljšana učinkovitost izrabe vode (WUE), povečana fotosinteza in izboljšana izraba mineralnih hranil (Drake in sod., 1997, cit po Maček, 2004; Murray in sod., 1997, cit po Maček, 2004). Posledično CO₂ vpliva na spremembe v kemijski sestavi rastlinskih tkiv (npr. večje C/N razmerje).

Raziskave učinkov CO₂ na rastline potekajo po vsem svetu. Gre za zaplinjevalne poskuse, v katerih se proučuje predvsem odgovor rastlin na podvojeno sedanjo atmosfersko koncentracijo CO₂. Večina teh poskusov je zaradi velikih stroškov zaplinjevanja kratkotrajne narave (nekaj dni do nekaj tednov), v zadnjem času pa je bilo izvedenih tudi precej večjih poskusov, v katerih je šlo za večletno spremljanje učinkov. V vseh poskusih najpogosteje vrednotijo anatomske, morfološke in biokemijske spremembe na nadzemnih delih rastlin (največkrat rast, izrabo vode, asimilacijo ogljika in porazdelitev asimilatov, dihanje). Rezultati so zelo razlikujejo glede na tip rastlin in na rastne razmere, npr. glede na prehranjenost z dušikom (povzeto po Maček, 2004).

2.2.2 Koruza (*Zea mays* L.) in povečana koncentracija CO₂

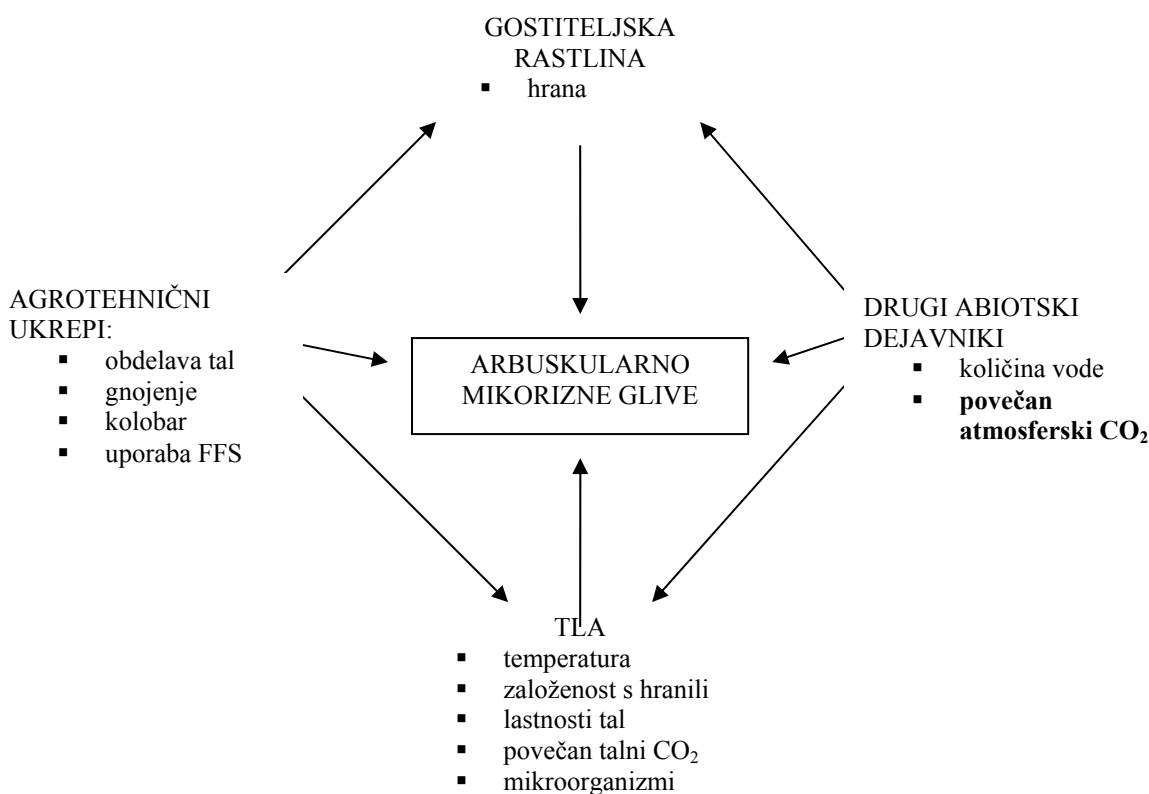
Koruza je ena najstarejših kulturnih rastlin, saj so v Mehiki našli storž iz leta 7200 pr.n.št. Danes je v globalnem pomenu tretji najpomembnejši vir energije in proteinov v človeški prehrani, takoj za pšenico in rižem ter četrta (na prvem mestu je pšenica, sledita riž in ječmen) po svetovni pridelavi žit. V zadnjih štiridesetih letih se je njena pridelovalna površina povečala za 40 %, pridelki na hektar pa iz dveh na štiri tone. Kot kulturo jo najdemo okrog sveta od 50 °s. z. š. do 40 °j. z. š. (Young in Long, 2000), kultivarje prilagojene na nizke temperature v severni Franciji in koruzo za silažo na Danskem, Nizozemskem in Angliji do 55 °s. z. š. (Miedema in sod., 1987 cit. po Young in Long, 2000; Long, 1999 cit. po Young in Long, 2000). Je kazalec uspešnega poljedelstva in je vrsta na kateri temelji glavni del pridelave mesa (Kotar in Brus, 1999). V Sloveniji jo pridelujejo na površini cca. 100.000 ha.

Spada v družino trav (*Poaceae*). Agronomi jo uvrščamo med prosasta žita, za katera je značilno, da so jarine, kar pomeni, da za vznik potrebujejo temperature višje od 10 °C (optimalna temperatura 18-21 °C), poleti pa za normalno rast od 15,5 do 17 °C. Najbolj ji

ustrezajo združbe rjavih tal, nastalih na naplavinah rek ali na morenah nekdanjih ledenikov. Ta tla so dobro zračna, strukturirana in vsebujejo dovolj humusa (2-3,5 %). Dobro uspeva tudi na ilovnatih tleh, ki so nastala na apnencih in dolomitih, na laporjih, peščenjaki in na barjanskih tleh (Tajnšek in sod., 1991). Koruza je poleg sirka (*Sorghum bicolor* L.) edina tako svetovno razširjena in kmetijsko pomembna C₄ rastlina. C₄ rastline imajo poseben metabolizem, ki kopiči oz. veže CO₂ v C₄ spojine in koncentrira CO₂ na mestih karboksilacije ribuloze 1,5, bifosfata v celicah žilnega ovoja. Tak metabolizem je torej prilagoditev C₄ rastlin na premajhno (suboptimalno) koncentracijo CO₂ v listu in hkrati omogoča tudi uspešnejšo izrabo vode. Pričakovati pa je, da globalno naraščanje CO₂ v atmosferi pri C₄ rastlinah v primerjavi s C₃ rastlinami ne bo imelo tako izrazitega stimulatívne vpliva na fotosintezo (Vodnik in sod., 2000).

Če so rastline, tudi koruza, dalj časa izpostavljene povečani koncentraciji CO₂, lahko včasih opazimo tudi negativen vpliv na rast. Do tega lahko pride, ker rastlina ni zmožna pravočasno razviti dovolj tkiv (korenin), ki bi bila ponor za ogljikove hidrate. Med negativne vplive štejemo: zmanjšanje fotosintezne aktivnosti in koncentracije rubisca, akumuliranje škroba v listih in zmanjšanje količine dušika v rastlini (Vodnik in sod., 2000).

2.3 MIKORIZA IN POVEČANA KONCENTRACIJA CO₂



Slika 3: Povezanost dejavnikov, ki vplivajo na arbuskularno mikorizne glive.

Sestava zraka v tleh se zelo razlikuje od atmosferske. Razlika je predvsem v količini CO₂, ki ga je lahko tudi sto krat več kot v atmosferi. Količina CO₂ je odvisna od tipa, lastnosti tal, vsebnosti vode, količine mikroorganizmov, stopnji njihove aktivnosti... Globalno povečanje atmosferske koncentracije CO₂ verjetno neposredno ne vpliva na mikorizne glive, saj so prilagojene na dosti večje koncentracije CO₂ v tleh, pač pa je učinek posreden preko delovanja CO₂ na gostiteljsko rastlino.

Rastline se odzovejo na povečano koncentracijo CO₂ (glej poglavje 2.2.1) in s spremenjenim delovanjem vplivajo na AM glive. Rastlina in gliva sta medsebojno tesno povezani (poglavje 2.1). Če torej zaradi povečanega atmosferskega CO₂ narastejo fotosintezne kapacitete rastline in se privzem vode poveča, je rast rastline večja (e.g., Bazzaz 1990 cit. po Rillig in sod., 2002), biomasa korenin se poveča, potem lahko rastlina daje več asimilatov AM glivam. Tako povečan atmosferski CO₂ poleg drugih dejavnikov (prikazanih na Sliki 3) deluje na AM glive. Zaradi večje količine hrane se lahko količina AM micelija v tleh precej poveča (4-5 krat večja dolžine hif gliv v tleh) (Treseder in Allen, 2000, cit. po Rillig in sod., 2002). S tem proizvajajo AMG več glomalina in delež ogljika v tleh se poveča (Rillig in sod., 1999, cit. po Maček, 2004). Vendar ni nujno, da so pri vseh rastlinah isti odzivi. Pri robinji (*Robinia pseudoacacia*), ki je N - fiksirajoča rastlina, so pri povečanem CO₂ zabeležili manjšo povečanje mase korenin pri rastlinah z AM glivami (31% večja biomasa) kot pri rastlinah brez AM gliv (114% večja masa) (Olesniewicz in Thomas 1999, cit. po Rillig in sod., 2002). Pri ozkolistnemu trpotcu (*Plantago lanceolata*) so zabeležili povečano neto fotosintezo in biomaso korenin ob povečani koncentraciji CO₂, le da je bila rast še večja pri rastlinah z AM glivami (Staddon in sod., 1999 cit po Rillig in sod., 2002). Spet tretje raziskave pa kažejo, da ni povezave med arbuskularno mikorizo in povečanim CO₂ (Jongen in sod., 1996, cit. po Rillig in sod., 2002; Rouhier in Read, 1998, cit. po Rillig in sod., 2002).

Kljub večji količini hif AM gliv pa ni nujno, da se koloniziranost korenin spremeni². Nekaj raziskav je pokazalo, da ni prišlo do spremembe pri kolonizaciji, druge pa so zabeležile celo zmanjšanje koloniziranosti pod vplivom povečane koncentracije CO₂ (Rillig in sod., 2002). Razlog, da se koloniziranost ne spremeni je v spremembi rastlinske biomase pri povečanem CO₂. Ta se bistveno poveča, prav tako se sorazmerno večja tudi biomasa struktur AM gliv. Več kot je gliv, več glomalina proizvajajo, le-ta pa izboljšuje strukturo tal. Tako je bila pri poljskem poskusu s krmnim sirkom (*Sorghum bicolor*) ugotovljena večja dolžina hif gliv in večji delež glomalina, ki je povečal zmožnost tal za zadrževanje vode (Rillig in sod., 2001).

Poleg vpliva, ki ga ima povečan CO₂ preko rastlin na AM glive, je zaznati vpliv višje temperature tal nanje, ki je posledica višanja koncentracije okoljskega CO₂ (Slika 3). Ne vedo še natančno v kolikšni meri zaradi spremenjene temperature na glive vpliva gostitelj,

² Pri proučevanju koloniziranosti korenin sta v uporabi predvsem dve metodi: merjenje koloniziranosti korenin z AM glivami z intersekcijsko metodo ali merjenje dolžine vseh koloniziranih korenin na rastlino (vezikli, arbuskuli in hife znotraj korenin).

v kolikšni pa temperatura. Slednja mogoče vpliva na življenjsko dobo hif gliv in hitrejše kroženje ogljika, zato je nujno raziskati vpliv talne temperature na hitrost odmiranja in nastajanja (življenjsko dobo) hif. Prav tako Fitter s sod. (2004) predlaga raziskave, ki bi pokazale v kolikšni meri so AMG prilagojene na druge abiotske dejavnike.

2.4 NARAVNI IZVIRI CO₂

Naravni izviri CO₂, ki jih imenujemo tudi mofete³, nastajajo na mestih, kjer so bila v preteklosti ali pa so še danes 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) in zato je delež kisika toliko manjši (Brady in Weil, 1999 cit. po Maček, 2004). Pojav, ko je kisika v tleh le 3-12,5 %, se imenuje hipoksija, to je pomanjkanje kisika v tleh. V primeru, ko kisika sploh ni, govorimo o anoksiji (Buchanan, 2000 cit. po Maček, 2004). Prav tako je povečana koncentracija CO₂ v zraku okrog vrelcev. Običajna okoljska koncentracija CO₂ je 0,03 % in ni nevarna. Z naraščanjem koncentracije postaja CO₂ toksičen. Pri 5 % koncentraciji povzroča draženje, pri vdihovanju 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 (Slika 4). Ponavadi je sestava plina, ki izhaja iz vrelcev naslednja: CO₂ (50 – 99,9 %), dušik (5 - 10 %), metan (do 3,2 %) in žveplove spojine v sledeh (H₂S in / ali SO₂) (Pfanž in sod., 2004).

Neposredno ob vrelcih na travniku, je lahko koncentracija CO₂ v tleh ekstremno velika in lahko dosega 100 % koncentracijo CO₂ (Pfanž in sod., 2004). Količina CO₂ v zraku okrog vrelcev niha med 0,036 in 1 %, glede na vremenske razmere. Pri redčenju in mešanju geogenega CO₂ z atmosferskim zrakom imata pomembno vlogo hitrost in smer vetra.

Neposredno ob vrelcih ni vegetacije oz. je zelo prizadeta. Z oddaljenostjo od vrelcev se inhibitorni učinek CO₂ zmanjšuje in višina rastlin se večja. V predhodnih raziskavah je bilo pokazano, da je rast negativno korelirana s koncentracijo CO₂ v tleh (Pfanž in sod. 2004).

³ sulfatare - žveplove vrelci in fumarole – vrelci tople vode oz. vodne pare

Meritve talne koncentracije plinov se zato uporabljajo za določitev plinskega režima in izpostavitve posameznih rastlin na območju mofete.



Slika 4: Večji vrelc CO₂ v gozdu v kraju Stavešinski vrh, neposredno ob Stavešincih (levo) in razpadajoče truplo manjšega ptiča tik ob vrelec (desno).

2.4.1 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 izvirih, 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 vrelih 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 tudi 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 t.j. z manj učinkovito zgradbo za privzem hranil zaradi spremenjenih anatomskih značilnosti, je prikrajšana celotna rastlina. To se med drugim kaže v manjši koncentraciji elementov kot so fosfor (P), kalij (K) in žveplo (S) v listih nekaterih 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).

2.4.2 Naravno povečana koncentracija CO₂ in arbuskularne mikorizne glive

Mikoriza pri koruzi je dokaj dobro raziskana, tako v kontroliranih pogojih (rastlinjaki, komore,...) kot tudi v poljskih poskusih. Prav tako je bilo v povezavi s problemom globalnih sprememb veliko raziskav o vplivu povečanega (podvojenega) atmosferskega CO₂ na mikorizne simbionte. Veliko manj je raziskano področje, ki zajema naravne talne izvire CO₂ in mikorizo, čeprav je teh nahajališč po Evropi in svetu veliko. Tiste raziskave, ki zajemajo vpliv naravno povečane koncentracije CO₂ na mikorizne glive, ki kolonizirajo korenine koruze, še niso dokumentirane, saj jih ob izčrpnem pregledu literature nismo našli. Nekaj podatkov smo zasledili le v doktorski disertaciji (Maček, 2004), ki obravnava odzive korenin rastlin na naravnih izvirih CO₂.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 IZVIRI CO₂ V STAVEŠINCIH

V Severovzhodni Sloveniji, znani po geotermalnih vrelih, ki jih predvsem izkoriščajo za zdraviliški turizem, leži manjši kraj Stavešinci, kjer raziskovalci iz Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin Biotehniške fakultete v Ljubljani raziskujejo mofete. Gre za 3000 m² veliko agrarno področje ob regionalni cesti Stavešinci-Ivanjševci, kjer iz nekaj vrelcev na plan prihaja zelo čist CO₂ brez primesi drugih plinov. Domačini so pred kratkim na tem področju opustili pridelovanje kulturnih rastlin zaradi premajhnega pridelka. Tako je del poskusne površine opuščen in zarasel predvsem s travami, pionirskimi zelmi in enoletnimi neofiti, na drugi polovici pa je bilo leta 2002 polje koruze, ki je bilo eksperimentalnega pomena. To sezono (2005) je parcela porasla s travo (Slika 5).



Slika 5: Parcela, na kateri je bilo 2002 leta poskusno polje koruze, je označena s črnim okvirjem. Na predelih rjave barve, označenih s puščico, so mofete.

3.2 OPIS POSKUSA

Na eksperimentalni ploskvi sta dva večja izvira talnega CO₂ z maksimalno izmerjeno koncentracijo CO₂, in sicer 26,7 %. Poskusno polje je veliko 400 m² (dolgo 40 m in široko 10 m), podrobnejše rastne meritve pa so bile opravljene na površini 153 m². Lastnosti tal so naslednje: pH 4,4; organska snov 5,3 %; skupni N 0,25 %; razmerje C/N 1:12,3; dostopni P₂O₅ 293 mg/kg; dostopni K₂O 232 mg/kg; CEC 204 mmol_c/kg. Tu je bila v maju 2002 posejana koroza (*Zea mays* L., hibrid 'DK 312', Dekalb, ZDA). Pred setvijo koroze, v začetku maja 2002 leta, smo zemljišče pognojili s 600 kg/ha N : P : K (7 : 20 : 30). Ponovno gnojenje s KAN - om (27 % N) v količini 500 kg/ha smo izvedli v začetku junija.



Slika 6: Shema poskusa. S puščicami sta označeni palici, s pomočjo katerih smo naredili mrežo z 1 m² kvadrati (v nadaljevanju parcelice). Iz vsake parcelice posebej smo vrednotili rastne parametre rastlin.

3.3 VZORČENJE NA TERENU

Dne 12. 9. 2002 smo na poskusnem polju koroze v Stavešincih opravili žetev in odvzeli vzorce korenin in substrata za laboratorijsko analizo t.j. za ocenjevanje kolonizacije z arbuskularno mikorizo in za vsebnost glomalina v substratu v absorpcijskem območju

korenin. Da bi lahko ovrednotili povezavo med pridelkom koruze in koncentracijo talnega CO₂ smo žetev opravili po parcelicah velikosti 1 m² (1 m × 1 m; 153 parcelic). Najprej smo vrednotili rastne parametre koruze: velikost in masa rastlin, število in masa storžev za vsako m² parcelo posebej (Pertoci, 2005; Vodnik in sod., 2005). Višino rastlin smo merili od tal do konca moškega socvetja (metlice). Na podlagi rasti koruze smo na izbranih parcelicah, ki sta predstavljali ekstrema (skupini 15-ih parcelic »velik CO₂« in »majhen CO₂«, glej sliko 5) odvzeli vzorce za proučevanje arbuskularne mikorize. Višina rastlin koruze se z večanjem koncentracije CO₂ manjša. To pomeni, da smo odvzeli korenine koruze pri manjših rastlinah - na parceli s povečanim talnim CO₂ (izmerjena koncentracija je znašala 7,32 %) in pri normalno visokih rastlinah - na parceli z manjšim talnim CO₂ (koncentracija 0,64 %). Z lopato smo izrezali posamezen vzorec, ki je zajemal celoten koreninski sistem (celotno koreninsko grudo). Vsakega posebej smo nato spravili v plastične vrečke. Teden dni po žetvi smo na isti površini v merilni mreži z ločljivostjo enega metra izmerili talno koncentracijo CO₂, ki je eden izmed najpomembnejših parametrov pri našem poskusu. Tako je bilo ocenjenih 153 m² (17 × 9 m) polja, na vsaki parcelici pa je bila opravljena ena meritev.

3.4 MERJENJE TALNE KONCENTRACIJE CO₂

Talno koncentracijo CO₂ smo merili s prenosnim analizatorjem plinov GA 2000 Ansyco (Slika 7), ki se uporablja pri ekoloških in geoloških raziskavah. Ta naprava ima vgrajen IRGA detektor (infra red gas analyser). Meritev temelji na dejstvu, da molekula CO₂ dobro absorbira v infrardečem delu svetlobnega spektra. Merilnik deluje na principu presvetljevanja vzorca zraka z virom infrardeče (IR) svetlobe (Ni-Cr žarnica, 600-800 °C) in meri stopnjo IR sevanja ob prehodu skozi vzorec, iz katere izračunamo absorpcijo in koncentracijo plinov. Z njim lahko merimo koncentracijo ogljikovega dioksida (CO₂) in metana (CH₄). Za meritve kisika (O₂), žveplovodika (H₂S) pa je dodatno vgrajena elektrokemična celica.



Slika 7: Prenosni analizator plinov GA 2000 s talno sondo (Foto: D. Vodnik).

Koncentracijo talnega CO₂ smo izmerili enkrat, in sicer teden dni po vzorčenju. Koncentracijo smo merili v sredini vsake parcelice, velike 1 m² tako, da smo izvrtali 20 cm globoko luknjo s premerom 2 cm. V to luknjo smo napeljali cev naprave. Ta je s pomočjo črpalke vlekla zrak iz tal. Koncentracije vseh plinov smo si izpisali takrat, ko je aparat zabeležil najmanjšo koncentracijo O₂ oz. maksimalno koncentracijo CO₂. Koncentracije drugih plinov nismo beležili, saj so bile premajhne, da bi jih aparat zaznal.

3.5 LABORATORIJSKO DELO

Substrat iz vzorcev smo ločili od korenin ročno. Pred čiščenjem z vodo smo iz korenin otresli substrat, ki je bil tik ob koreninah in ga shranili kot vzorec rizosfernih tal za določitev količine glomalina. Korenine smo nato izpirali pod tekočo vodo. Ko so bile čiste, smo z britvico odrezali apikalne dele korenin koruze s premerom 0 - 2 mm, dolge približno 2 cm. Nato smo koreninice spravili v stekleničko in jih fiksirali v 70 % etanolu za kasnejše postopke. Del rizosfernih tal smo posušili v sušilniku pri 40 °C in jih označene spravili za določevanje glomalina.

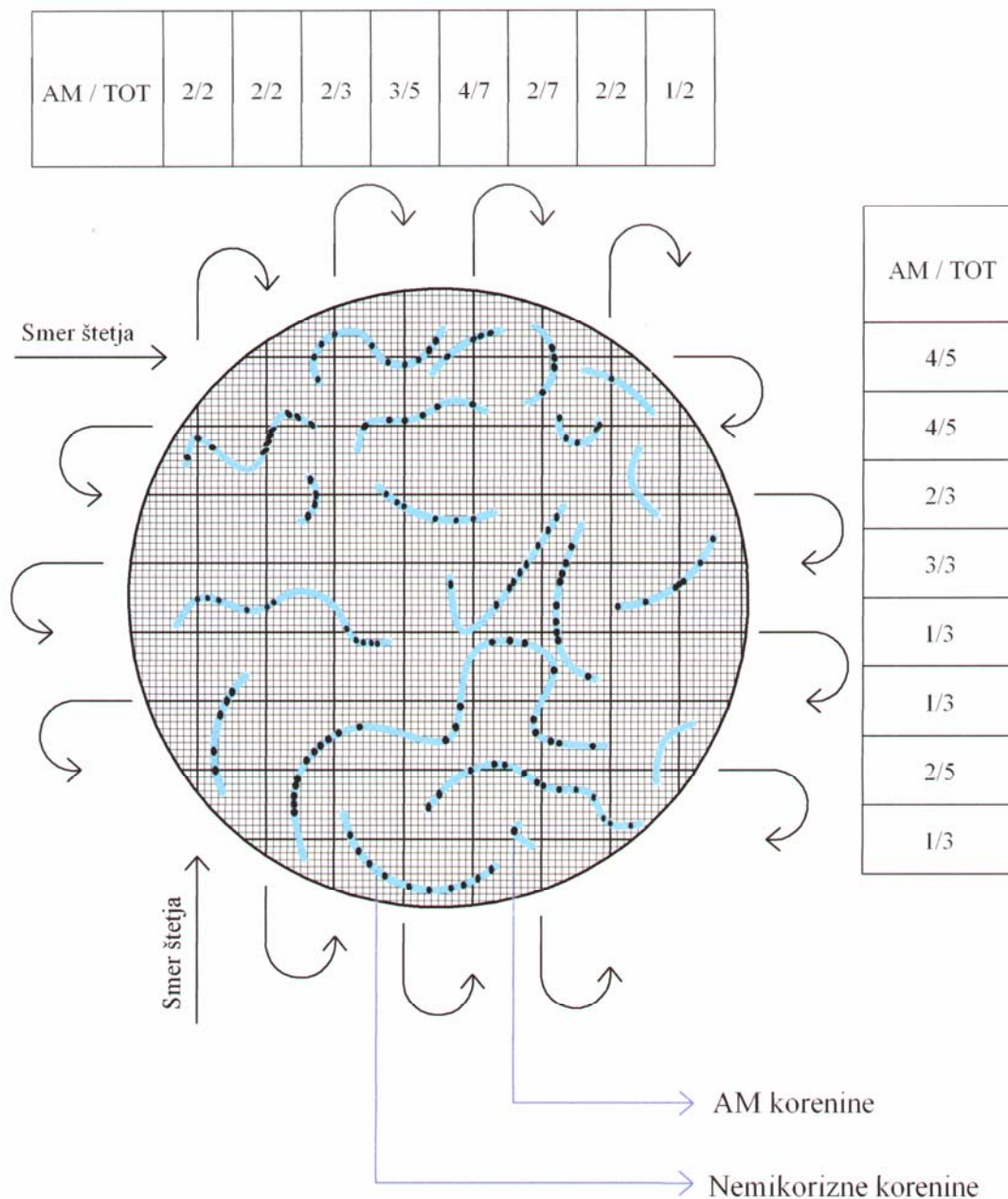
3.5.1 Barvanje s tripan modrim

Fiksirane korenine smo najprej dobro sprali z destilirano vodo. Nato smo jih dali v označene epruvete, preko katerih smo napeli in prilepili bombažno mrežico tako, da smo lažje odlivali kemikalije in spirali koreninice. Potem, ko smo odlili vodo, smo korenine presvetljevali tako, da smo jih prelili z 10 % (v/v) raztopino KOH in jih za 5-10 min dali v sušilnik na 90 °C. Po temeljitem spiranju z navadno in na koncu z destilirano vodo smo dolili 0,05 % barvilo tripan modro in epruvete segrevali v sušilniku 15 min na 90 °C. Omenjeno barvilo obarva hitin v celični steni gliv. Za raztopino barvila smo potrebovali: 560 mg tripan modrega barvila, 280 ml deionizirane vode, 235 ml 88 % mlečne kisline in 440 ml glicerola. Ko so se epruvete ohladile smo barvilo odlili in vzorce spirali z laktoglicerolom. Za raztopino laktoglicerola smo zmešali: 280 ml deionizirane vode, 230 ml mlečne kisline in 445 ml glicerola. V tej raztopini smo tudi hranili vzorce pri temperaturi 4 °C za ocenjevanje infekcije korenin in za mikroskopiranje. Laktoglicerol se je čez čas obarval modro, kar pomeni, da je nase vezal odvečno tripan modro barvilo.

3.5.2 Interseksijska metoda določevanja kolonizacije pri arbuskularni mikorizi

Na dno petrijevke s premerom 9 cm smo nalepili milimetrski papir na katerem smo posebej označili centimetske črte tako, da smo dobili mrežo z 1 cm² velikimi kvadrati. Nanjo smo dali del korenin iz vzorca in jih prelili z laktoglicerolom. Previdni smo morali biti pri količini dodanega laktoglicerola. Če ga je bilo premalo se je površina korenin, ki niso bile prekrite s tekočino, preveč svetila in ocenjevanje ni bilo mogoče. Pri preveliki količini pa

so se koreninice po petrijevki premikale. S pomočjo pincete in secirne igle smo koreninice razporedili po petrijevki tako, da se niso dotikale ali prekrivale (Slika 3). Korenine smo vrednotili pod stereolupo po metodi, ki so jo opisali Hamel in sod. (1990) (glej razlago v naslovu slike). Mikroskop smo uporabili po potrebi tedaj, ko nismo bili popolnoma prepričani za kakšno strukturo gre. V takem primeru smo naredili preparat in ga z mikroskopom pogledali pod 100 kratno povečavo. Da bi ocenili možen vpliv pristranskosti pri izvedbi intersekcijske metode, smo v izvedbo vključili še drugega ocenjevalca in tako dobili dve neodvisni oceni. Rezultati te primerjave so podani v diskusiji. Zaradi precejšnje skladnosti ocen smo pri nadaljnji obdelavi podatkov uporabili njuno povprečje. Za vsako rastlino smo pregledali štiri vzorce, ki so bili odvzeti iz skupnega vzorca obarvanih korenin. Dodatno je bil vsak vzorec obravnavan dvakrat, tako smo ga prešteli, premešali in znova prešteli.



Slika 8: Intersekcijna metoda. V smereh puščic se štejejo vsi horizontalni in vertikalni preseki korenin na poudarjenih črtah. Preseke korenin v posamezni liniji, ki so kolonizirani z AMG zapisujemo pod oznako »AM«, vse preseke pa pod oznako »TOT«. Barvilo tripan modro je obarvalo AM strukture temno modro, ostale nekolonizirane korenine pa svetlo modro.

3.5.2.1 Ocenjevanje koloniziranosti pri arbuskularni mikorizi

Šteli smo vsa presečišča korenin s horizontalnimi in vertikalnimi črtami, ne glede na koloniziranost (označili smo jih kot celotne korenine ali TOT kor.-totalne korenine) in tiste stike, kjer so bile vidne strukture (vezikli, arbuskuli, intracelularne in intercelularne hife) arbuskularnih mikoriznih gliv (AM kor. - AM korenine) (Slika 3).

Dobljene podatke smo vstavili v enačbo:

$$\text{kolonizirane korenine } [\%] = \frac{\text{število presekov z arbuskularnimi glivami}}{\text{število vseh presekov}} \times 100 \quad \dots(1)$$

in dobili odstotek korenin, ki so kolonizirane z AM glivami.

3.5.3 Ekstrakcija glomalina (po Wright in sod., 1996, Wright in Upadhyaya, 1996, Wright in Upadhyaya, 1998)

Z ekstrakcijo odstranimo glomalin iz tal in ga lahko v taki obliki uporabimo za nadaljnje analize. Vzorce smo odvzeli na enakih mestih kot vzorce za analizo koloniziranosti korenin z arbuskularno mikorizo. Iz koreninskih grud smo vzorčili rizosferna tla. Po vzorčenju smo vzorce posušili pri 40 °C, jih v terilnici zdrobili in jih nato presejali skozi sito z 2 mm odprtinami. Tako pripravljene vzorce smo shranili do nadaljnjih analiz.

3.5.3.1 Ekstrakcija lahko izločljivega glomalina EEG (easily extractable glomalin)

V centrifugirke smo odtehtali 1 g tal, jih prelili z 8 ml 20 mM natrijevega citrata in jih avtoklavirali 30 min pri 120 °C in 1,2 atm. Takoj po avtoklaviranju smo 15 min centrifugirali pri 4.000 RPM. Supernatant z glomalinom smo odlili in ga shranili pri 4 °C. Z merilnim valjem smo izmerili celoten volumen ekstrakta. Pelet (kar je ostalo od 1 g tal) smo presejali skozi 200 µm sito. Grobi ostanek (skeletne delce večje od 200 µm) smo posušili pri 110 °C, ga stehali in njegovo maso odšteli od izhodne mase vzorca (1 g).

3.5.3.2 Ekstrakcija skupnega glomalina TG (total glomalin)

Enako kot pri prejšnji ekstrakciji smo odtehtali 1 g tal, jih prelili z 8 ml 50 mM natrijevega citrata, vzorce eno uro avtoklavirali pri enakih pogojih in jih centrifugirali pri enaki hitrosti kot v primeru ekstrakcije EEG. Nato smo supernatant odlili in cikel ponavljali tako dolgo dokler je bilo opaziti rdeče rjavo barvo v vzorcih, ki je značilna za glomalin. Supernatante posameznih ciklov smo združevali v skupen ekstrakt, kateremu smo na koncu izmerili

volumen. Potem smo iz skupnega ekstrakta (supernatanta) odpipetirali 1 ml vzorca v Eppendorfove epruvetke in jih 4 min centrifugirali pri 10.000 RMP. S tem smo odstranili še zadnje delce v supernatantu vzorca. Te vzorce smo v manj kot tednu dni uporabili, do analiz pa smo jih hranili v hladilniku. Le tako smo lahko izključili možnosti kontaminacije vzorcev.

3.5.3.3 Analiza proteinov (Bradfordov test)

Gre za standardno analizo količine proteinov v vzorcu (Bradford, 1976 in Wright in sod., 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 pogojih. Pri tem testu gre za reakcijo, katere produkt je sprememba barve. Barvilo je rdeče barve (dvojna protonizirana oblika). 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 hitrejšje, 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 pufru PBS tako, da smo v 80 ml deionizirane vode raztopili 0,730 g pufru PBS. Ta količina je zadostovala za tri plošče.

Priprava vzorcev: epice (Eppendorfove epruvetke) z vzorci smo 4 min centrifugirali na 10.000 RPM. Po barvi vzorcev smo določili količino vzorca, ki smo ga dajali v luknjice na plošči, in sicer za lahko izločljivi glomalin 5 µl in za skupni glomalin pa 10 µl 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 µl PBS v 63 luknjic. Za tem smo iz vsakega izmed 21 ekstrahiranih vzorcev dodali 5 µl 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 µl PBS in 10 µl vzorca.

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

V tako pripravljeno ploščico smo v prve štiri vrstice dodali 50 µl 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) odčitali pri absorpciji 595 nm rezultate. Postopek smo ponovili za naslednje štiri vrstice plošče.

3.5.3.4 Izračun količine glomalina

Čitalec plošč nam je izpisal absorbanco vzorcev. S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje smo izračunali količino glomalina v posamezni luknjici elisa ploščice. Nato smo to količino (μg/luknjico) preračunali v μl/luknjico, pri čemer smo upoštevali volumen vzorca, ki je bil za lahko izločljivi glomalin 5 μl/luknjico in za skupni glomalin 10 μl/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:

$$K. G. \left[\frac{mg}{g} \right] = \frac{Kon. G. [\mu g]}{V_v [\mu l]} \times \frac{V_e [\mu l]}{M_v [mg]} \quad \dots(2)$$

Pomen oznak pri enačbi 2:

<i>K. G.</i>	količina glomalina na maso tal (mg/g)
<i>Kon. G.</i>	koncentracija glomalina, odčitana iz umeritvene krivulje (μg)
<i>V_v</i>	volumen vzorca ekstrakta, dodanega na luknjico ploščice (μl)
<i>V_e</i>	celotni volumen ekstrakta (μl)
<i>M_v</i>	masa vzorca tal (mg) upoštevajoč delež skeleta (glej 3.5.3.1)

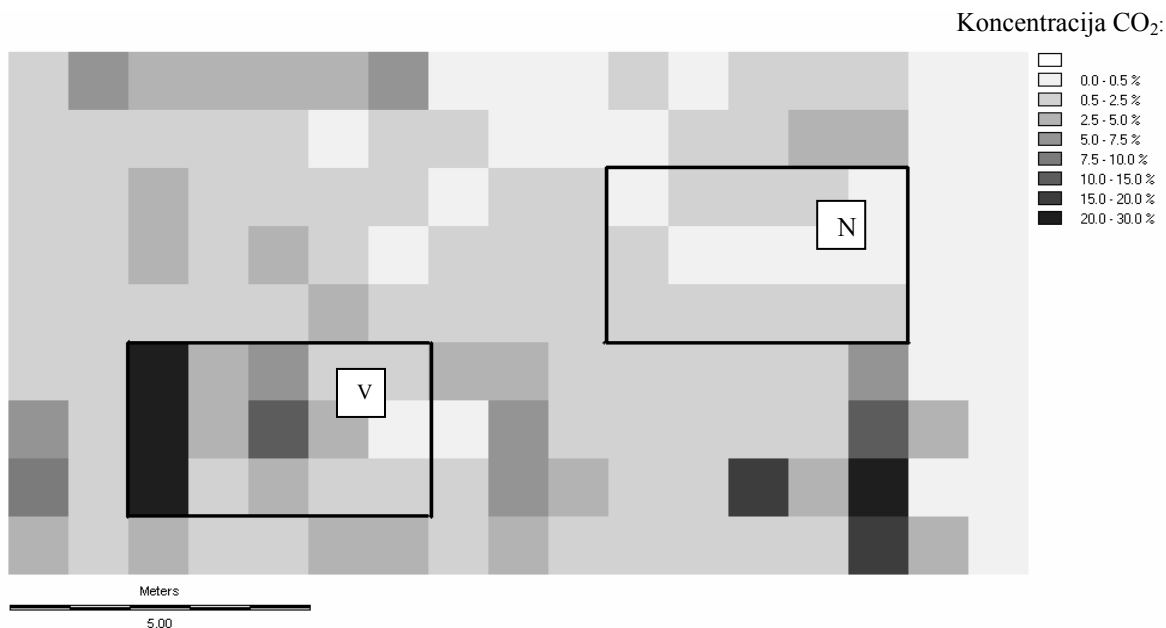
3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program Statgraphics, za grafične prikaze pa program Excel. Za vse parametre smo izračunali povprečja in standardne deviacije. Podatke o mikorizni kolonizaciji smo ovrednotili z dvosmerno analizo variance, pri čemer smo kot faktor poleg režima CO₂ upoštevali tudi razlike ocenjevalca. Za izračun količine obeh (lahko izločljivega in skupnega) glomalinov pa smo uporabili enosmerno analizo variance.

4 REZULTATI

4.1 MERITVE TALNE KONCENTRACIJE CO₂

Talno koncentracijo CO₂ smo merili s prenosnim merilnikom, ki je meril koncentracije plinov v tleh.



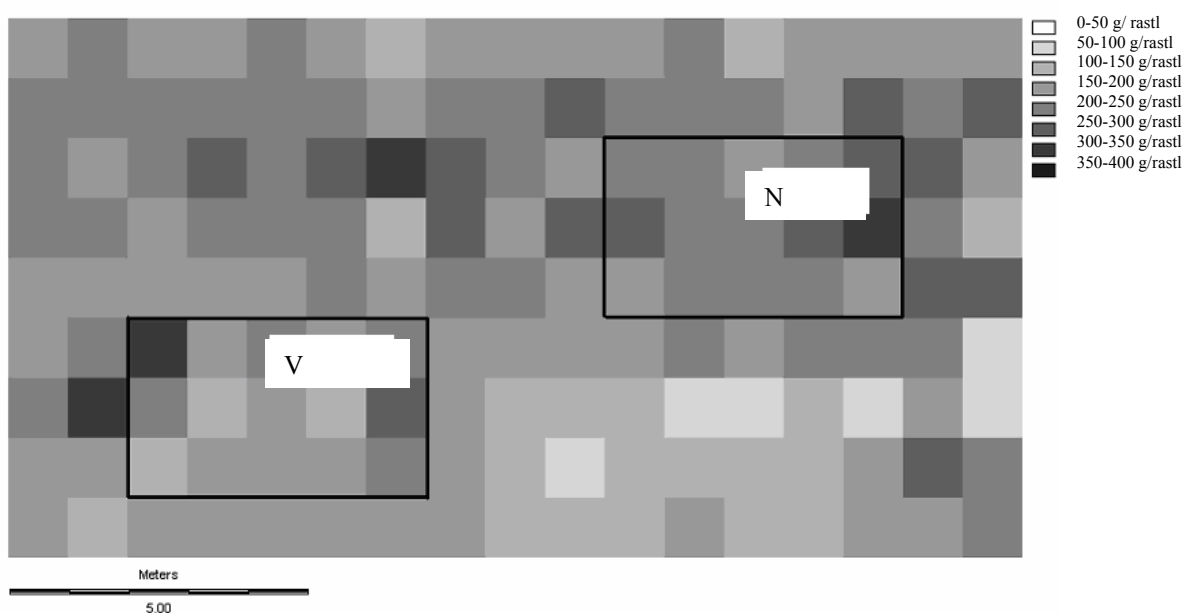
Slika 9: Izmerjene koncentracije talnega CO₂ v %, iz katerih se lepo vidijo velika odstopanja v koncentracijah talnega CO₂ med sosednjimi parcelicami. Vsak kvadrateg predstavlja eno meritev in 1 m². Iz obeh obrobjenih okvirjev velikosti 15 m² so bili odvzeti vzorci za analizi koloniziranosti korenin z arbuskularno mikoriznimi glivami ter za količino glomalina v rizosferi. Levi okvir predstavlja območje s povečano (večjo) talno koncentracijo CO₂, zato je označen s črko »V«, desni pa predstavlja majhno oz. nizko talno koncentracijo CO₂ in smo ga označili s črko »N«.

Na poskusni ploskvi, torej na vzorčenih 153 m², sta dva izvira talnega CO₂, kar je razvidno tudi iz zgornje slike. Vidimo, da so največje izmerjene koncentracije koncentrirane na dveh mestih: v levem okvirju (»V«) in skrajno desno pod desnim okvirjem (»N«). Na teh parcelicah je bila izmerjena najvišja koncentracija talnega CO₂, ki je znašala 26,7 %. Na območjih, kjer ni mofet, so talne koncentracije CO₂ nižje in se gibljejo med 0,1 in 0,5 %. Med sosednjimi parcelicami je velika razlika v izmerjenih koncentracijah CO₂, kar je lahko tudi posledica napak pri meritvah. Povprečna vrednost talne koncentracije CO₂ v »V« okvirju je znašala 7,3 %, v »N« okvirju pa 0,64 %.

4.2 RAST KORUZE

Rast koruze na celotni vzorčni ploskvi (153 m²) je bila heterogena. Ob obeh talnih izvirih CO₂ je bila višina rastlin zelo majhna (najmanjša). Z oddaljenostjo od izvirov se je povečevala. Na delih ploskve, kjer je inhibitorni učinek povečanega CO₂ prenehal, so bile rastline na videz približno enake višine.

Prav tako kot višina, se je spreminjala tudi suha masa zelinja (Slika 10). Višina in suha masa zelinja sta obratno sorazmerni s talnim CO₂. To pomeni, da se je masa zelinja zmanjševala s povečevanjem talnega CO₂.



Slika 10: Suha masa zelinja koruze na poskusni njivi v Stavešincih, ob žetvi septembra 2002. Vsak kvadrateg predstavlja povprečno suho maso zelinja vseh rastlin na površini 1 m². Okvirja predstavljata ploskvi iz katerih so bile odvzete rastline za opravljanje analize koloniziranosti korenin z arbuskularnimi mikoriznimi glivami ter za analizo količine glomalina v rizosferi.

V preglednici 1 so podani parametri za oba okvirja, iz katerih smo odvzeli vzorce za analizi koloniziranosti korenin z arbuskularno mikoriznimi glivami ter za količino glomalina v rizosferi.

Preglednica 1: Povprečje, najmanjša in največja vrednost koncentracije talnega CO₂ (%) in povprečje, najmanjša in največja višina rastlin (cm) pri povečani (»V«) in pri majhni (»M«) talni koncentraciji CO₂.

	Koncentracija CO ₂ (%)			Višina rastlin (cm)		
	povprečje	najmanjša vrednost	največja vrednost	povprečje	najmanjša višina	največja višina
Velik CO ₂	7,3	0,2	26,7	174	104	279
Manjši CO ₂	0,6	0,1	1,2	203	124	253

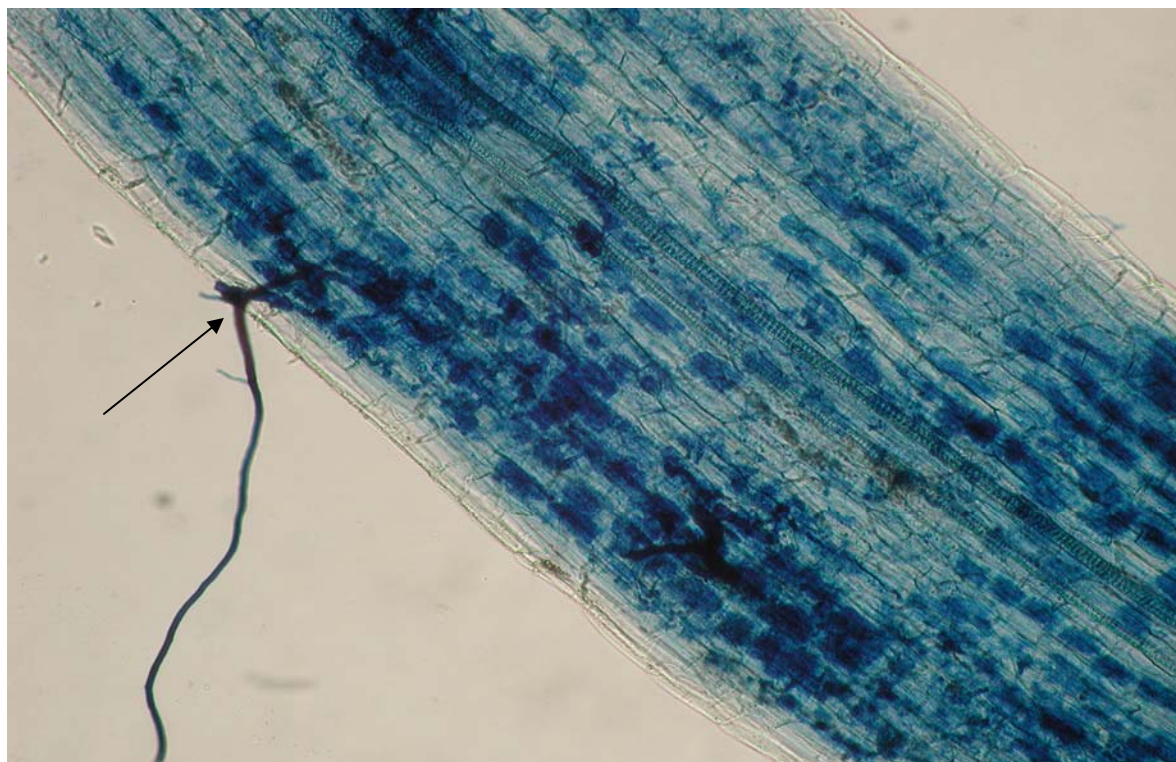
Talne koncentracije CO₂ znotraj okvirja »V« so zelo različne. Njihov razpon je od 0,2 pa vse do 26,7 %. Pri okvirju »N« ni tako velikih razlik med koncentracijami, saj najmanjša znaša 0,1 %, največja pa 1,2 %.

Povprečni višini koruze v obeh okvirjih se razlikujeta. Na območju povečane talne koncentracije CO₂ (okvir »V«), kjer je bila povprečna talna koncentracija CO₂ 7,3 %, je bila povprečna višina rastlin 174 cm, najmanjša višina 104 cm in največja 279 cm. V okvirju »N«, pri povprečni talni koncentraciji CO₂ 0,6 % pa je bila povprečna višina rastlin koruze večja in je znašala 203,2 cm. Najmanjša višina je znašala 124 cm in je bila večja od najmanjše višine rastlin pri velikem CO₂. Največja rastlina pri majhni koncentraciji CO₂ je v višino merila 253 cm in je bila manjša od največje rastline pri povečani koncentraciji CO₂. Za analize koloniziranosti korenin z AM glivami in za določanje glomalina v rizosferi korenin koruze, smo odvzeli vzorce pri manjših rastlinah v okvirju »V« in srednje rastline pri okvirju »N«.

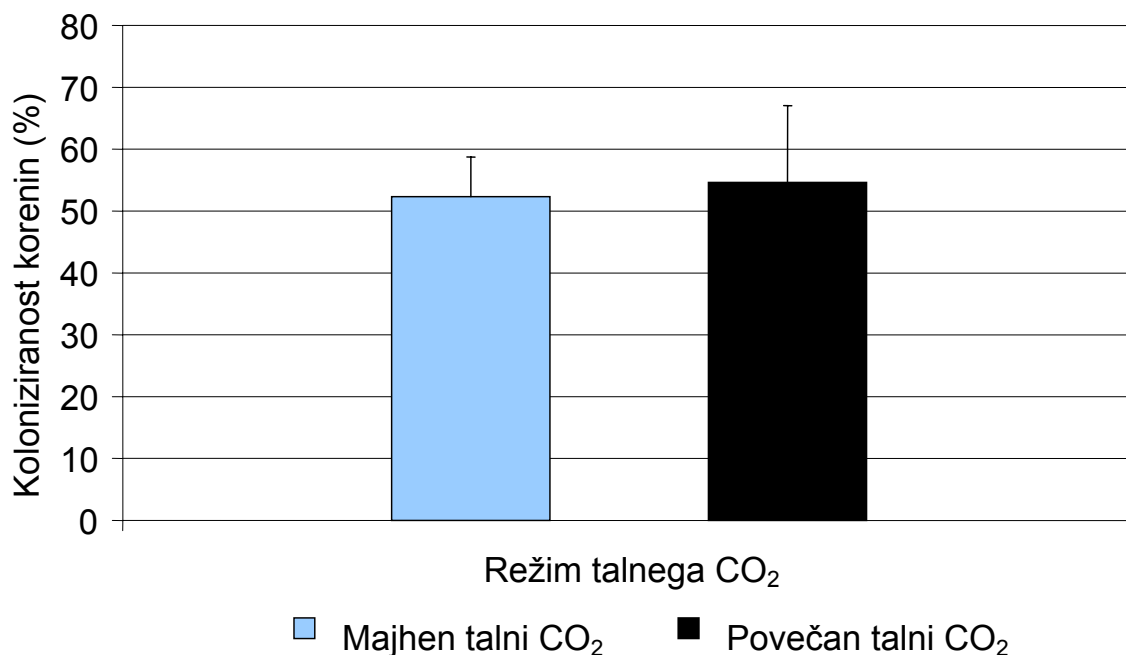
Preglednica 2: Parametri za maso storžev, maso zelinja in višino rastlin. Analiza je bila narejena v letu 2002. Prikazani so povprečje, najmanjša in največja vrednost posameznih rastnih parametrov.

	Povprečje	Najmanjša vrednost	Največja vrednost
Višina (cm)	181,0	99,0	223,0
Masa storžev na enoto površine (kg/m ²)	1,2	0,0	3,2
Masa zelinja na enoto površine (kg/m ²)	1,2	0,1	3,0

4.3 KOLONIZIRANOST KORENIN KORUZE Z ARBUSKULARNIMI MIKORIZNIMI GLIVAMI



Slika 11: Z AM glivami kolonizirana korenina koruze. Na sliki je vidno vstopno mesto hife glive v korenino rastline (apresorij je označen s puščico). Temnejši predeli znotraj celic so arbuskuli (Foto: I. Maček).

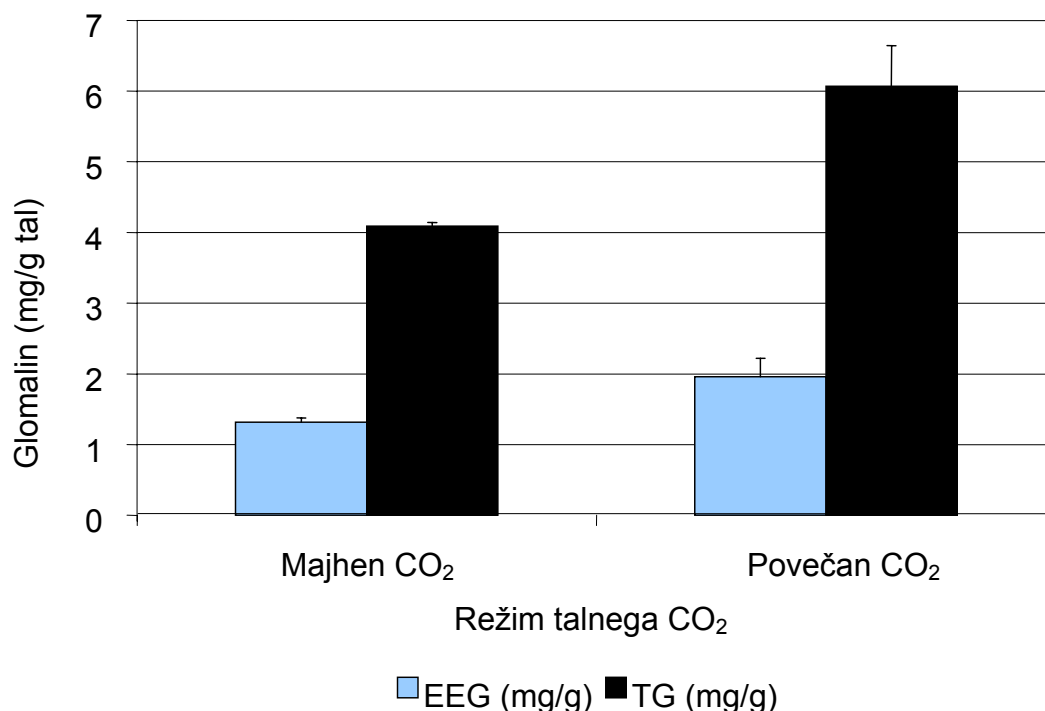


Slika 12: Povprečna koloniziranost korenin (%) pri majhni in povečani talni koncentraciji CO₂.

Koloniziranost korenin smo ocenjevali z intersekcijsko metodo (Slika 2 in Priloga A). Iz rezultatov (Slika 5 in Priloga B) je razvidno, da je pri normalni koncentraciji talnega CO₂ (»N«) povprečna koloniziranost korenin 52,3 %, pri povečani [CO₂] (»V«) pa je povprečna koloniziranost večja za 2,3 % in znaša 54,6 %. Ocenjevanje sta opravila dva ocenjevalca.

Statistična analiza (dvosmerna analiza variance) je pokazala, da je mikorizna kolonizacija neodvisna od talne koncentracije CO₂.

4.4 IZRAČUNI KONCENTRACIJE GLOMALINA



Slika 13: Količina lahko izločljivega (EEG) in skupnega (TG) glomalina (mg/g tal) pri majhni in povečani talni koncentraciji CO₂ s standardnimi napakami.

Preglednica 3: Povprečna količina lahko izločljivega (EEG) in skupnega (TG) glomalina (mg/g tal), njune standardne napake (SE), največje in najmanjše vrednosti (mg/g tal) pri povečani (»V«) in majhni (»N«) talni koncentraciji CO₂.

	Lahko izločljivi glomalin (mg/g tal)				Skupni glomalin (mg/g tal)			
	povprečni	SE	največji	najmanjši	povprečni	SE	največji	najmanjši
»V«	1,96	0,05	2,03	1,87	6,07	0,57	5,06	7,04
»N«	1,32	0,06	1,45	1,14	4,09	0,26	3,32	4,42

Količina lahko izločljivega glomalina (EEG) pri veliki talni koncentraciji CO₂ (»V«) je 1,96 mg/g tal in je za 0,64 mg/g tal večja od količine lahko izločljivega glomalina pri nižji talni koncentraciji CO₂ (»N«), ki je 1,32 mg/g tal. Prav tako je količina skupnega glomalina (TG) večja pri visoki koncentraciji CO₂. Pri manjši talni koncentraciji CO₂ znaša 4,09 mg/g tal, pri visoki talni koncentraciji CO₂ pa 6,07 mg/g tal.

Statistična analiza je pokazala statistično značilno razliko med lahko izločljivim glomalinom pri majhni in pri povečani talni koncentraciji. Tako lahko s tveganjem

$p=0,0006$ trdimo, da je količina lahko izločljivega glomalina pri večji talni koncentraciji CO₂ večja kot pri majhni. Prav tako lahko s tveganjem $p=0,017$ trdimo, da je količina skupnega glomalina večja pri povečani talni koncentraciji CO₂.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V povezavi s proučevanjem globalnih sprememb so vplivi povečane atmosferske koncentracije CO₂ na rast in razvoj rastlin dokaj dobro raziskani. Dobro alternativo raziskavam, kjer so bile rastline izpostavljene povečani koncentraciji CO₂ relativno kratek čas (kratkotrajni zaplinjevalni poskusi), ponujajo naravna rastišča s povečanim talnim CO₂. Rastline, ki so skozi več generacij izpostavljene geogenemu CO₂, so aklimatizirane ali morda celo genetsko adaptirane in imajo razvite določene mehanizme, s katerimi premostijo ekstremne razmere, to pomeni, da so bolj prilagojene. Da bi prepoznali te prilagoditve in jih uporabili pri napovedih učinkov globalnega povečanja CO₂ v atmosferi, je bila večina raziskav na mofetah opravljena na obstoječi naravni vegetaciji. Po drugi strani pa je malo znanega, kako se na naravno povečanje CO₂ odzivajo kmetijske rastline, kot je npr. koruza, ki je bila predmet naše raziskave.

5.1.1 Vpliv povečane talne koncentracije CO₂ na koloniziranost korenin koruze z arbuskularnimi mikoriznimi glivami

Simbioza med višjimi rastlinami in arbuskularnimi mikoriznimi glivami je predvsem odvisna od gostitelja oz. od njegovega posredovanja hrane AM glivam – rastlina jim običajno daje od 5 do 20 % fotosinteznih asimilatov (Smith in Read, 1997). To pomeni, da več kot bo AMG dobila ogljika, večja bo biomasa hif in struktur gliv in večja bo sorpcijska površina, s katere bo rastlina s pomočjo gliv črpala hranila in vodo. Veliko fotosinteznih asimilatov bo rastlina proizvedla le v optimalnih rastnih razmerah, to pomeni ob zadostni osvetlitvi, vlagi, temperaturi in ob primerni razpoložljivosti hranil v tleh.

Pri proučevanju mikorize na območju naravnega izvira CO₂ v Stavešincih moramo upoštevati, da močno povečane talne koncentracije CO₂ izrazito negativno vplivajo na rast rastlin (Vodnik in sod., 2005). To se je pokazalo tudi v poskusu s koruso (za podrobnejše rezultate o povezanosti CO₂ in pridelka koruze glej Pertoci, 2005). Povečana koncentracija CO₂ je na naš posevek delovala neposredno in posredno. Pri neposrednem učinku imamo v mislih predvsem delovanje velikih koncentracij CO₂ na procese v nadzemnih delih (listih; fotosinteza in dihanje) in koreninah (dihanje). Posreden vpliv geogenega CO₂ pa se kaže v spremembi lastnosti tal, predvsem v spremembi pH tal in redoks potenciala, kar posledično pomeni spremembo v dostopnosti hranil. Redoks potencial se lahko spremeni pri primanjkljaju kisika v tleh, ki nastopi npr. pri poplavljenih tleh, kjer voda izpodrine ves zrak iz makro-, mezo- in mikropor in tudi v tleh, ki so v bližini mofet. V tem primeru CO₂ iz tal izpodrine kisik in pojavi se hipoksija (pomanjkanje kisika). V anaerobnih razmerah v tleh pride do vezave vodikovih elektronov na druge elemente in ne na kisik, kot je to običajno. Ko se elementi reducirajo, spremenijo naboj, obliko in kot take jih rastline ne morejo sprejemati. Pravimo, da imajo taka tla negativen redoks potencial. Večina hranil je težje dostopna rastlini tudi zaradi nižje pH vrednosti, kar lahko prispeva k slabši rasti. pH

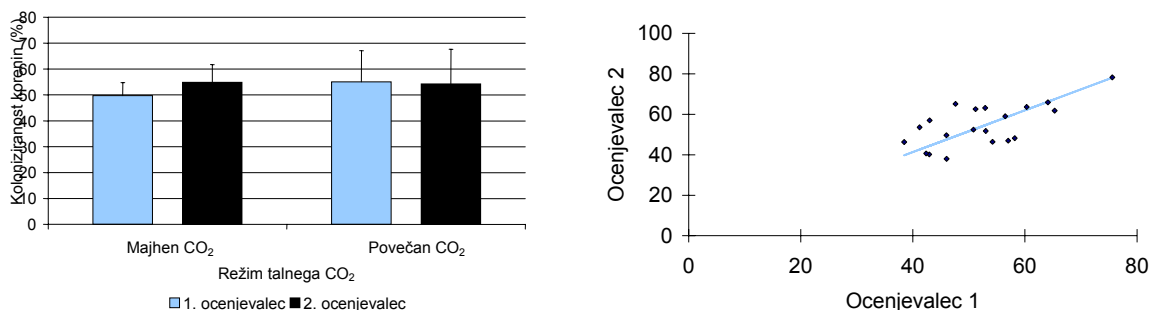
tal na poskusnem polju je bil le 4,4, kar pomeni da so makroelementi kot so N, P in K in nekateri mikroelementi težje dostopni (Leskošek, 1993). Ko so tla v takem stanju, rastlini ne pomaga niti gnojenje, saj hranila sproti spreminjajo obliko in so sicer v tleh v presežku, vendar rastlinam nedostopna.

Zaradi tako močne odvisnosti AM gliv od fotosintetsko vezanega ogljika in zgoraj omenjenih negativnih vplivov CO₂ na rastline, smo predvidevali, da bo AMG na koreninah koruze pri večji koncentraciji talnega CO₂ bistveno manj kot pri manjšem talnem CO₂. Rezultati interseksijske metode pa so bili za obe skupini rastlin precej izenačeni. Glede na zelo malo razliko v odstotku koloniziranosti korenin koruze z AM glivami pri majhnem in povečanem CO₂, lahko sklepamo, da povečana talna koncentracija CO₂ ni vplivala na razvoj, rast arbuskularnih gliv. To bi pomenilo, da je v danih razmerah bila zagotovljena zadostna oskrba AMG s fotosintati, in to kljub temu, da je bila rast nadzemnega dela precej zmanjšana.

Mikoriza bi lahko v razmerah povečane koncentracije CO₂ v tleh pomagala pri premostitvi težav z razpoložljivostjo nekaterih mineralnih hranil. Možno pa je tudi drugačno gledanje: odnos v mikorizi pojmuje kot simbiotski vse dotlej, dokler imata korist oba partnerja. Nemalokrat pa se zgodi, da rastlina vloži več v odnos (daje več fotosintetskih asimilatov) kot ji gliva vrača z izboljšano mineralno prehrano in drugimi pozitivnimi učinki. Tako je lahko v našem primeru možno, da so AMG delovale zaviralno na koruzo. Lahko, da je talni CO₂ imel učinke na dejavnike, ki so na odnos rastlina - gliva vplivali v tolikšni meri, da so AM glive postale za koruzo prevelik porabnik ogljikovih hidratov in jo navsezadnje parazitirale. Talni CO₂ je ob mofetah znižal pH tal in spremenil redoks potencial, dostopnost hranil se je zmanjšala in enako število AM gliv (enaka koloniziranost korenin) je opravilo manj dela (manj hranil za rastlino) kot glive v višjem pH okolju. Oboje AMG (velika in majhna koncentracija CO₂) pa so dobivale enako količino asimilatov od rastlin. Tako obstaja verjetnost, da so v takšnih razmerah za izpostavljeno koruzo AMG le nepotreben ponor asimilatov, ki še dodatno zavirajo razvoj namesto, da bi pomagale premostiti primanjkljaj hranil, kot so fosfor, dušik (nitrati), žveplo (sulfat – H₂S). Vsekakor bi bilo potrebno te domneve preveriti z analizo mineralnih hranil v tleh in rastlini ter z nadaljnjimi raziskavami.

Menimo, da so bila naša ocenjevanja obsega mikorizne infekcije na koreninah precej natančna, saj smo metodo testirali tako, da smo v izvedbo vključili še drugega ocenjevalca, vsak vzorec pa sta oba ocenjevalca dvakrat obravnavala. Pred začetkom ocenjevanja z interseksijsko metodo smo se poskušali uskladiti tako, da smo se dogovorili, katere strukture in preseke bomo upoštevali in katerih ne. Vse nejasne strukture smo reševali timsko s pomočjo pregledov korenin pri večjih povečavah na mikroskopu. Ob teh metodoloških ukrepih je vseeno prišlo do določenih razlik med ocenjevalcema, ki pa navsezadnje niso bile značilne, kar je pokazala tudi dvosmerna ANOVA (prvi faktor je bil CO₂, drugi pa ocenjevalec). Na spodnji sliki levo vidimo, da je ocenjevalec 1 ocenil koloniziranost pri velikem CO₂ 54,9 %, pri manjšem pa 49,7 %, medtem ko je ocenjevalec

2 ocenil, da je koloniziranost pri povečani talni koncentraciji CO₂ 54,2 %, pri majhni pa 54,9 %).



Slika 14: AM koloniziranost korenin koruze pri povečani in majhni koncentraciji CO₂ s standardnimi odkloni (levo) in primerjava (desno) za oba ocenjevalca.

Smatramo, da je predstavljalo večji problem od meritev z intersekcijsko metodo vzorčenje. Ob žetvi namreč nismo imeli na razpolago analizatorja za merjenje talne koncentracije CO₂.

5.1.2 Vpliv povečane talne koncentracije CO₂ na količino glomalina v tleh

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 tal (Rillig in sod., 2001), 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). V Stavešincih je bila količina glomalina večja pri povečani talni koncentraciji CO₂ in je znašala 6,07 mg/g, pri majhni talni koncentraciji CO₂ pa je bila 4,09 mg/g. Ti količini sta precej visoki (Wrightova je izmerila le 1,3 mg glomalina na g tal v intenzivni obdelavi in ta količina se je začela povečevati, ko so opustili obdelovanje) in lahko potrjujeta dejstvo, da obdelovanje tal vpliva na količino glomalina. Pred našim posevkom koruze je namreč na tem mestu vsaj tri leta rasla travna mešanica. Trave pa so dobre gostiteljice AM gliv, kar bi lahko še dodatno vplivalo na izmerjeno količino glomalina.

Zelo malo je znanega o »obnašanju« glomalina v tleh. Ni še čisto jasno v kakšnih razmerah ga AM glive najbolj proizvajajo, kdaj se najbolj odlaga, veže na talne delce in kako se v tleh razgrajuje. Predvidevajo, da ga visoka temperatura in visoka vlaga hitreje razgrajujeta (našli so zelo majhne količine glomalina v tropskih tleh), vendar so ga na Havajih našli v rekordni količini (preko 100 mg/g tal). Zato domnevajo, da v tem primeru na glomalin vplivajo velike količine železa, ki ga ščitijo ali pa talni organizmi (Wright in Nicholas,

2002). Kaj se bo dogajalo z glomalinom, je očitno odvisno od vsakega območja in tal posebej. Tako obstaja verjetnost, da povečana koncentracija talnega CO₂ vpliva na razgradnjo glomalina v tleh. Ne ve se še natančno, kateri mikroorganizmi sodelujejo pri razgradnji glomalina, za Stavešince pa je znano, da je mikrobna aktivnost na območju ob vrelcih zmanjšana (Maček, 2004), pričakovati pa je moč tudi spremembe v strukturi mikrobnih združb. Zato predvidevamo, da na višjo vsebnost glomalina pri velikem CO₂ lahko vplivajo mikroorganizmi oz. njihova odsotnost iz izpostavljenih predelov zemljišča. V tleh s povečanim CO₂ je bilo namreč več tako lahko izločljivega kot tudi skupnega glomalina, čeprav je bila koloniziranost korenin pri obeh koncentracijah talnega CO₂ skoraj enaka.

5.2.3 Metodološke izboljšave

Da bi bolje spoznali odnos koruza – AM gliva v tleh s povečano koncentracijo CO₂, bi morali poskus zastaviti malce drugače. Polovico koruze bi tako posejali v območju povečane talne koncentracije CO₂ v tla, ki bi jih pred setvijo razkužili (fumigirali) – odstranili vse propagule AM gliv. Drugo polovico pa bi posejali v nerazkužena tla. Na enak način bi zasejali področje z majhno talno koncentracijo CO₂. S tako zastavitvijo poskusa bi lahko bolje sklepali v kolikšni meri in kako na korožo vplivajo tla s svojimi spremenjenimi lastnostmi in kakšen vpliv imajo arbuskularno mikorizne glive.

Če bi analizator plinov imeli ob žetvi, bi lahko natančneje izbrali rastline iz območja z zelo povečano talno koncentracijo CO₂ in tiste rastline iz področja z majhno talno koncentracijo CO₂, saj bi lahko pred odvzemom vzorca izmerili talno koncentracijo CO₂ in se na njeni podlagi odločili za posamezne vzorce. Ugotovili smo, da se talna koncentracija CO₂ zelo hitro prostorsko spreminja, kar lahko vidimo v velikih spremembah koncentracij med sosednjimi parcelicami (Slika 9). Zato bi morali meriti koncentracijo na manjše razdalje in mogoče tudi večkrat, saj lahko pride tudi do napak v meritvah. Najugodnejše bi bilo, če bi merili koncentracijo talnega CO₂ natanko ob koreninah tiste rastline, ki bi jo kasneje ocenjevali ali še natančneje, ob tistem delčku korenin koruze, ki bi jih vrednotili, iz enakih tal pa analizirali vsebnost glomalina. Talno koncentracijo CO₂ bi merili tudi večkrat v rastni dobi.

Za boljše razumevanje, kako velik CO₂ deluje na rastlino v celoti in kakšen je privzem hranil pri znižanem pH tal in spremenjenem redoks potencialu, bi analizirali tla in tkiva rastlin. Vsebnost elementov v tleh kot so dušik, fosfor, kalij nam da pomemben podatek o založenosti tal. Prav tako bi nam dali vpogled v procese, ki potekajo v tleh, predvsem na stopnjo denitrifikacije (proces, ki ga ne želimo v tleh). Na listnih tkivih koruze pa bi analizirali delež ogljika, dušika, fosforja, razmerje C/N... S primerjavo posameznih elementov iz tal in iz rastlinskih tkiv, bi lahko bolj z gotovostjo sklepali o vplivu povečane koncentracije CO₂ na rast koruze in o deležu asimilatov, ki jih prispevajo AM glivam.

Z omenjenimi izboljšavami bi lažje ocenili naravo in pomen mikorize na območju mofete.

5.2 SKLEPI

- Povečana koncentracija geogenega CO₂ je zavirala rast koruze (*Zea mays* L.).
- Povečana talna koncentracija CO₂ ne vpliva na koloniziranost korenin koruze z AMG. Kar nakazuje, da je bila v danih razmerah zagotovljena zadostna oskrba AMG s fotosintati, in to kljub temu, da je bila rast nadzemnega dela precej zmanjšana.
- Mikoriza bi lahko v razmerah povečane koncentracije CO₂ v tleh pomagala pri premostitvi težav z razpoložljivostjo nekaterih mineralnih hranil.
- Velik obseg mikorize na rastlinah, ki so izpostavljene prekomernim koncentracijam CO₂, bi po drugi strani lahko predstavljal tudi prekomeren ponor ogljikovih hidratov.
- Pri povečani koncentraciji talnega CO₂ je bila količina lahko izločljivega glomalina za 0,64 mg/g tal večja kot pri manjši talni koncentraciji CO₂. Prav tako je bila količina skupnega glomalina pri povečani koncentraciji talnega CO₂ večja za 1,98 mg/g tal kot pri manjši.
- Povečana talna koncentracija CO₂ vpliva na količino glomalina v tleh.
- Velika količina lahko izločljivega in skupnega glomalina na poskusni njivi bi lahko bila delno povezana tudi z rabo te površine v preteklih letih (negnojenje, brez mehanske obdelave tal, travišče).
- Večja količina glomalina v tleh s povečano talno koncentracijo CO₂ bi lahko bila posledica počasnejše razgradnje glomalina.

6 POVZETEK

Na 400 m² velikem poskusnem polju z geogenimi izviri CO₂ v kraju Stavešinci, smo proučevali vpliv povečane talne koncentracije CO₂ na prisotnost mikorizne simbioze pri koruzi in na vsebnost glomalina, produkta AM gliv v tleh. Koruzo (*Zea mays* L.) smo kot testno rastlino izbrali, ker je tako v slovenskem kot tudi v svetovnem merilu ena izmed najpomembnejših kulturnih rastlin, ker so jo v preteklosti na istem mestu že sejali in ker je vpliv povečanih atmosferskih koncentracij nanjo dobro raziskan.

Podrobneje smo analizirali rastline koruze na 153 parcelicah, velikih 1 m². Merili smo višino rastlin, maso storžev in skupno maso. Meritve talnih plinov smo izvedli s prenosnim analizatorjem plinov GA 2000 Ansyco. Za določevanje AMG infekcije in deleža glomalina na ekstremnih mestih smo odvzeli vzorce pri povečani (povprečna koncentracija 7,32 % CO₂) in majhni (povprečna koncentracija 0,64 % CO₂) talni koncentraciji CO₂.

V laboratoriju smo prave korenine koruze debelinskega razreda 0 – 2 mm očistili, presvetlili s KOH in pobarvali z barvilom tripan modro, ki obarva hitin v hifah in strukturah gliv. Odstotek koloniziranosti korenin koruze smo ovrednotili z intersekcijsko metodo. Koloniziranost korenin sta vrednotila dva ocenjevalca. Za količino glomalina v tleh smo del rizosfernih tal koruze posušili v sušilniku pri 40 °C, jih zdrobili in presejali. Opravili smo ekstrakcijo lahko izločljivega in ekstrakcijo skupnega glomalina. Količino glikoproteina (glomalina) v tleh smo določili z Bradfordovim testom. Dobljene podatke smo statistično analizirali s programom Statgraphics in prikazali s programom Excel.

Ugotovili smo, da je povečan CO₂ zaviral rast rastlin koruze, saj je bila najmanjša koruza neposredno ob mofeti, z oddaljenostjo od vreca pa se je višina koruze povečevala. Prav tako je bila masa suhega zelinja manjša pri velikem CO₂.

Koloniziranost korenin koruze z AMG po intersekcijski metodi je bila skoraj enaka pri povečani in pri majhni talni koncentraciji CO₂. Pri manjšem CO₂ je znašala 52,3 %, pri velikem CO₂ pa 54,6 %. Tako lahko sklepamo, da CO₂ ne vpliva na koloniziranost korenin koruze. To nakazuje, da je bila v danih razmerah zagotovljena zadostna oskrba AMG s fotosintati, in to kljub temu, da je bila rast nadzemnega dela precej zmanjšana. Tako bi lahko mikoriza v razmerah povečane koncentracije CO₂ v tleh pomagala pri premostitvi težav z razpoložljivostjo nekaterih mineralnih hranil. Vendar pa lahko velik obseg mikorize na rastlinah, ki so izpostavljene prekomernim koncentracijam CO₂, po drugi strani predstavlja tudi prekomeren ponor ogljikovih hidratov.

Pri povečani talni koncentraciji CO₂ sta bili obe frakciji glomalina večji kot pri majhnem CO₂. Količina lahko izločljivega glomalina je bila za 0,64 mg/g tal večja pri velikem CO₂ in je znašala 1,96 mg/g tal. Količina skupnega glomalina je bila za 1,98 mg/g tal večja pri povečani kot pri majhni talni koncentraciji CO₂ in je znašala 6,07 mg/g tal. Velika količina lahko izločljivega in skupnega glomalina na poskusni njivi bi lahko bila delno povezana

tudi z rabo te površine v preteklih letih (negnojenje, brez mehanske obdelave tal, travišče). Večja količina glomalina v tleh s povečano talno koncentracijo CO₂ pa bi lahko bila posledica počasnejše razgradnje glomalina.

7 VIRI

- Amerian M. R. 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on water stress and recovery in maize (*Zea mays* L.). Asian Agriculture Congress. Manila (Philippines). 24-27 Apr 2001. V: Food security and environment protection in the new millenium: 314 str.
- Bi Y. L., Li X. L., Christie P., Hu Z.Q., Wong M.H. 2003. Growth and nutrient uptake of arbuscular mycorrhizal maize in different depths of soil overlying coal fly ash. *Chemosphere*, 50: 863 –869
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive metod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Braunberger P. G., Miller M. H., Peterson R. L. 1991. Effect of phosphorus-nutrition on morphological-characteristics of vesticular-arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist*, 119: 107-113
- Chen B. D., Christie P., Li X. L. 2001. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere*, 42: 185-192
- Clark R. B., Zeto S. K. 1996. Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 28: 1505-1511
- Csiro forest tree and forest products.1999.
<http://www.ffp.csiro.au/resarch/mycorrhiza/root.html>
- Douds D. D., Nagahashi G., Pfeffer P. E., Kayser W. M., Reider C. 2005. On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Canadian Journal of Plant Science*, 85: 15-21
- Fitter A. H., Heinemeyer A., Husband R., Olsen E., Ridgway K. P., Staddon P. L. 2004. Global environmental change and the biology of arbuskular mycorrhizas: gaps and challenges. *Canadian Journal of Botany-revue Canadienne de Botanique*, 82: 1133-1139
- Fries L. L. M., Pacovsky R. S., Safir G. R., Kaminski J. 1998. Phosphorus effect on phosphatase activity in endomycorrhizal maize. *Physiologia Plantarum*, 102: 162-171
- Gaur A., Adholeya A. 2000. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza*, 10: 43-48
- Gavito M. E., Miller M. H. 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant and Soil*, 198: 185-192
- Hamel C., Fyles H., Smith D. L. 1990. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three vital stains. *New phytologist*, 115: 297-302

- Jansa J., Mozafar A., Kuhn G., Anken T., Ruh R., Sanders I. R., Frossard E. 2003. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological applications*, 13: 1164-1176
- Kabir Z., O'Halloran I. P., Fyles J. W., Hamel C. 1998. Dynamics of the mycorrhizal symbiosis of corn (*Zea mays* L.): effects of host physiology, tillage practice and fertilization on spatial distribution of extra-radical mycorrhizal hyphae in the field. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 68: 151-163
- Khaliq A., Sanders F. E. 1997. Effects of phosphorus application and vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth and phosphorus nutrition of maize. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 1607-1616
- Kotar M., Brus R. 1999. Naše drevesne vrste. Ljubljana, Slovenska matica: 320 str.
- Kothari S. K., Marschner H., Romheld V. 1991. Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and Soil*, 31: 177-185
- Leskošek. M. 1993. Gnojenje: za velik in kakovosten pridelek, za izboljšanje rodovitnosti tal, za varovanje narave. Knjižica za pospeševanje kmetijstva. Ljubljana, Kmečki glas: 197 str.
- Maček I. 2004. Odziv korenin izbranih kmetijsko pomembnih vrst na naravno povečano koncentracijo CO₂. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 127 str.
- Maček I., Vodnik D. 2005. Glomalin, protein arbuskularnih mikoriznih gliv. Lepilo strukturnih agregatov in pomembna komponenta organske snovi tal. *Proteus*, 67: 244-251
- Marschner H., Dell B. 1994. Nutrient - uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 159: 89-102
- Young K. J., Long S. P. 2000. Crop ecosystem responses to climatic change: maize and sorghum. V: *Climate change and global crop productivity*. Reddy K. R., Hodges H. F. (eds.). Oxon, CABI Publishing: 107-131
- Pertoci K. 2005. Rast koruze (*Zea mays* L.) v razmerah naravno povečane koncentracije CO₂. Univerzitetno diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 39 str. (v tisku)
- Pfanz H., Vodnik D., Wittmann C., Aschan G., Raschi A. 2004. Plants and geothermal CO₂ exhalations – Survival in and adaptation to a high CO₂ environment. *Progress in botany*, 65: 499-538
- Rawat A. K., Khare A. K., Thompson J. P. 1996. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phosphorus and zinc nutrition of maize (*Zea mays*) grown in Vertisols of Madhya Pradesh. *Indian journal of agricultural sciences*, 66: 33-37

- Rillig M. C., Wright S. F., Nichols K. A., Schmidt W. F., Torn M. S. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and soil*, 233: 167 - 177
- Rillig M. C., Treseder K. K., Allen M. F. 2002. Global change and mycorrhizal fungi. V: *Mycorrhizal ecology*. Van der Heijden M. G. A., Sanders I. R. (eds.). Springer: 135-160
- Smith S. E., Read D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Second Edition. London, Academic Press, 605 str.
- Subramanian K. S., Charest C., Dwyer L. M., Hamilton R. I. 1995. Arbuskular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New phytologist*, 129: 643 - 650
- Tajnsšek T., Milevoj L., Čergan Z., Osvald J. 1991. *Koruzna*. Knjižica za pospeševanje kmetijstva. Ljubljana, Kmečki glas: 180 str.
- Talukdar N. C., Germida J. J. 1993. Propagation and storage of vesicular-arbuskular mycorrhizal fungi isolated from saskatchewan agricultural soils. *Canadian journal of botany-Revue canadienne de botanique*, 71: 1328-1335
- Tuba Z., Raschi A., Lanini G. M., Nagy Z., Helyes L., Vodnik D., Sanita di Toppi L. 2003. Plant response to elevated carbon dioxide. V: *Abiotic Stresses in Plants*. Sanita di Toppi L., B Pawlik – Skowronska (eds.) Kluwer Academic Publisher: 157 – 204
- Vodnik D., Turk B., Pfanz H., Batič F., Wittmann C., Kaligarič M., Zupan M. 2000. Rast in delovanje rastlin pri povečanih koncentracijah ogljikovega dioksida ob naravnih virih CO₂. V: *Zbornik predavanj Varstvo zraka v Sloveniji*. Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 250-211
- Vodnik D., Šircelj H., Kastelic D., Maček I., Pfanz H., Batič F. 2005. The effects of natural CO₂ enrichment on the growth of maize. *Journal of crop improvment*, 13: 193-212
- Weissenhorn I., Leyval C., Belguy G., Berthelin J. 1995. Arbuskular mycorrhizal contribution to heavy - metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza*, 5: 245-251
- Wright S. F., Nicholas K. A. 2002. Glomalin: Hiding place for a third of the world's stored soil carbon. *Agricultural Research*.
<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/sep02/soil0902.htm> (12. mar. 2003)
- 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*, 161, 9: 575-586
- Wright S. F., Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein product by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198: 97-107

ZAHVALA

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

Zahvaljujem se Marjanci Jamnik za pomoč pri vsem laboratorijskem delu naloge in sošolki Katarini za ocenjevanje korenin.

Navsezadnje se najlepše zahvaljujem mami Mariji in očetu Dragu ter bratu Boštjanu, ki so me bodrili in me podpirali skozi vsa obdobja šolanja ter seveda mojemu dragemu Franciju za vso potrpežljivost in razumevanje.

Hvala vsem!

PRILOGA A

Obrazec za ocenjevanje kolonizacije korenin z AMG po intersekcijski metodi

INTERSEKCIJSKA METODA ZA OCENJEVANJE KOLONIZACIJE KORENIN Z ARBUSKULARNO MIKORIZO

Oznaka vzorca:

HIGH CO₂: 8.

Datum ocenjevanja in ocenjevalec/ -ka:

12. 3. 2003, Helena ROJHT

Datum in kraj nabiranja:

Stavešinci, 12. 9. 2002

Rastlina:

koruza

HORIZOTALNO:

ČRTA	AM	TOT
1	4	6
2	8	17
3	9	16
4	8	13
5	9	11
6	6	10
7	2	3
8	3	8
VSOTA	49	84

VERTIKALNO:

ČRTA	AM	TOT
1	8	11
2	10	13
3	6	11
4	8	15
5	7	18
6	3	10
7	2	4
8	2	2
VSOTA	46	84

KOLONIZIRANA KORENINA (%): 54,54

((AM / TOT) horiz. + (AM / TOT) VERTIK.) / 2 × 100 = ((49 / 84) + (46 / 84)) / 2 × 100

PRILOGA B

Izračuni za koloniziranost korenin koruze (%), njihova povprečna vrednost (%) in standardni odklon pri majhni in povečani talni koncentraciji CO₂ za oba ocenjevalca.

	Koloniziranost korenin (%)	
	majhen talni CO ₂	povečan talni CO ₂
1. ocenjevalec	57,0	75,6
	43,0	64,1
	47,6	60,3
	51,2	56,5
	52,9	58,2
	54,2	42,9
	50,8	42,4
	53,0	38,5
	41,2	46,0
	46,0	65,3
Povprečje	49,7	55,0
Standardni odklon	5,1	12,1
2. ocenjevalec	47,0	78,3
	57,0	65,9
	65,2	63,6
	62,6	61,8
	63,2	59,0
	46,4	48,2
	52,4	40,2
	49,7	40,7
	51,8	46,3
	53,6	38,0
Povprečje	54,9	54,2
Standardni odklon	6,8	13,4
Skupno povprečje	52,3	54,6
Skupni standardni odklon	6,4	12,4
Standardna napaka	1,4	2,8

PRILOGA C

Količine lahko izločljivega glomalina (EEG) in skupnega glomalina (TG) v mg/g tal ter njune povprečne vrednosti.

Vzorec	[CO ₂]	EEG (mg/g)	Povprečni EEG	TG (mg/g)	Povprečni TG
1	V	1,995	1,873	4,822	5,061
		1,782		5,880	
		1,841		4,482	
5	V	1,975	2,026	5,454	6,096
		1,987		6,427	
		2,118		6,409	
3	V	1,941	1,994	6,550	7,041
		1,950		8,200	
		2,092		6,372	
4	N	1,489	1,366	4,434	4,333
		1,323		4,143	
		1,286		4,422	
2	N	1,311	1,320	1,311	3,315
		1,144		4,148	
		1,504		4,486	
6	N	1,453	1,446	4,445	4,284
		1,508		3,792	
		1,376		4,616	
7	N	1,178	1,142	4,717	4,422
		1,144		4,101	
		1,104		4,449	