

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ines ŠTRAUS

**TIPI EKTOMIKORIZE PRI SADIKAH BUKVE
(*Fagus sylvatica* L.) V RIZOTRONIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ines ŠTRAUS

**TIPI EKTOMIKORIZE PRI SADIKAH BUKVE
(*Fagus sylvatica* L.) V RIZOTRONIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**TYPES OF ECTOMYCORRHIZA ON BEECH SEEDLINGS
(*Fagus sylvatica* L.) IN RHIZOTRONS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Gozdarskem inštitutu Slovenije, Oddelek za gozdno fiziologijo in genetiko.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Hojko Kraigher.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	Dr. Jasna Dolenc Koce Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo
Član:	Prof. dr. Hojka Kraigher Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za gozdno fiziologijo in genetiko
Član:	Dr. Samar Al Sayegh Petkovšek ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d. o. o.

Datum zagovora: 2. 7. 2010

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

Ines ŠTRAUS

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.14:582.28:582.632(043.2)=163.6
KG	Tipi ektomikorize/PCR/sekvenciranje rDNK/DGGE/dendrogram/fenofaze/bukev
KK	
AV	ŠTRAUS, Ines
SA	KRAIGHER, Hojka
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	TIPI EKTOMIKORIZE PRI SADIKAH BUKVE (<i>Fagus sylvatica</i> L.) V RIZOTRONIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 140 str., 32 preg., 27 sl., 4 pril., 91 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Glive predstavljajo ključno povezovalno biotsko komponento med elementi gozdnega ekosistema, predvsem med viri hranil in drevesnimi partnerji v simbiozi – ektomikorizi. Spremenjene razmere v okolju, zaradi naravnih sprememb ali človekovih vplivov se odražajo tudi na ektomikorizi. V poskusu smo spremljali pojavljanje ektomikoriznih gliv na sadikah bukve v rizotronih pri štirih različnih temperaturnih pogojih (15-25° C, 15-25° C ob hlajenju korenin, 30-50° C, zunanja temperatura zraka v Ljubljani). Za kar najbolj učinkovito določevanje tipov ektomikorize smo uporabili kombiniran pristop določevanja po anatomsko morfoloških lastnostih tipov, določevanje s primerjavo pomnoženih nukleotidnih zaporedij ITS1-5.8S rDNK-ITS2 ribosomalne regije z javno dostopnimi bazami GenBank in metodo izrisovanja filogenetskih dreves. Skupaj smo identificirali 7 tipov ektomikorize na sadikah bukve. Rezultati vzorčenja ektomikorize so pokazali, da je pestrost ektomikoriznih tipov različna glede na temperaturni režim okolja rasti sadik v rizotronih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 581.14:582.28:582.632(043.2)=163.6
CX Types of ectomycorrhizae/PCR/rDNK sequencing/DGGE/phylogram/phenofases/
beech
CC
AU ŠTRAUS, Ines
AA KRAIGHER, Hojka
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
PY 2010
TI TYPES OF ECTOMYCORRHIZA ON BEECH SEEDLINGS
(*Fagus sylvatica* L.) IN RHIZOTRONS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 138 p., 32 tab., 27 fig., 4 ann., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Fungi represent the key biotic link between the sources of mineral nutrients and symbiotic, predominantly ectomycorrhizal tree partners in forest ecosystems. Changes in the environment caused by natural changes or human influence are reflected in ectomycorrhiza. We have monitored the occurrence of ectomycorrhizal fungi on beech seedlings growing in rhizotrones at four different temperature regimes (at 15-25° C, at 15-25° C with cooling of roots, at 30-50° C, exposed to the outside air temperature in Ljubljana). The combination of morphological and anatomical characteristics, identification of types of ectomycorrhiza by comparing sequences of the ITS1-5.8S rDNK-ITS2 ribosomal region with the ones obtained from publicly available databases (GenBank) and construction of phylogenetic trees were used to achieve the best possible identification of ectomycorrhizal types. We identified seven types of ectomycorrhiza on studied beech seedlings. The results have shown that diversity of ectomycorrhizal types varied according to the temperatures in the environment, where the seedlings were grown.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	IX
Kazalo prilog.....	X
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček.....	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKORIZA	3
2.2 Oblike mikorize	4
2.2.1 Funkcije mikorize	6
2.2.2 Vplivi podnebnih sprememb na funkcije ektomikoriznih gliv	9
2.2.3 Pestrost ektomikorize	10
2.3 NAČINI IDENTIFIKACIJE GLIV V EKTOMIKORIZI	11
2.3.1 Določevanje ektomikorize na osnovi morfoloških in anatomskih struktur plašča	11
2.3.2 Identifikacija gliv v ektomikorizi z uporabo molekularnih markerjev	12
2.4 BUKEV	14
2.4.1 Fenofaze	15
2.4.2 Vpliv suše na bukev in ektomikorizo	16
2.4.3 Tipi ektomikorize na bukvi	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 Materiali	18
3.1.1 Kompleti	18
3.1.2 Puferske raztopine	18
3.2 Metode	18
3.2.1 Pilotni poskus kot vir izhodnega materiala za analize ektomikorize	18
3.2.2 Vzorčenje, čiščenje in določevanje tipov ECM	27
3.2.3 Identifikacija ektomikorize	28
3.2.4 Sledenje prisotnosti ektomikoriznih gliv v vzorcih substrata	35
3.2.5 Predstavitve rezultatov	39
4 REZULTATI	40
4.1 Tipi ektomikorize na bukvi	40
4.1.1 Kratki opisi tipov ECM	40
4.1.2 Združitev tipov ektomikorize	70
4.1.3 Primerjava pojavljanja tipov ECM v pilotnem poskusu pri različnih pogojih	71
4.1.4 Pestrost ektomikorize	75
4.2 Dokazovanje ECM v vzorcu zemlje z metodo DGGE	76
4.3 Fenofaze na bukvi	78
4.3.1 Deleži fenofaz na sadikah bukve pri različnih pogojih	78
4.3.2 Spreminjanje fenofaz na sadikah bukve	81
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	84
5.1 RAZPRAVA	84
5.1.1 Tipi ektomikorize na bukvi	85

5.1.2	Pojavljanje tipov ektomikorize na sadikah bukve iz pilotnega poskusa	89
5.2	Fenofaze na bukvi	92
5.3	Vpliv različnih temperatur na pestrost ektomikorize	93
5.4	SKLEPI	94
6	POVZETEK.....	97
7	VIRI.....	99

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Pregled odnosov med organizmi (biotskih interakcij) (povzeto po Killham, 1994: 63).....	3
Preglednica 2: Oblike mikorize s skupinami gliv, ki vstopajo v posamezno obliko, skupine rastlinskih partnerjev, izbrane značilnosti in splošno geografsko pojavljanje posamezne oblike. Povzeto po podatkih v Smith in Read, 2008: 5; Read in sod., 2004: 1245, Read, 1991.....	5
Preglednica 3: Povprečne temperature zraka pri posameznem poskusu, merjene v sklopu novega poskusa.	23
Preglednica 4: Povprečne temperature izmerjene v substratu v kasetah novega poskusa	24
Preglednica 5: Povprečne izmerjene vlage v substratih v posameznem poskusu (novi poskus) merjene ročno s sondo ECH ₂ O [®] EC5 Moistu (Decagon devices) in avtomatsko, v milivoltih (mV) na globini od 10 do 15 cm.	26
Preglednica 6: relativna zračna vlažnost zraka v komori in rastlinjaku, merjena v času novega poskusa.....	26
Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje v PCR, sestavine, proizvajalci in količina za končni volumen reakcije 25 µl.	32
Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in sekvenčni reakciji	32
Preglednica 9: PCR program za pomnoževanje ITS regij.	33
Preglednica 10: Reakcijska mešanica za pomnoževanje v PCR, sestavine, proizvajalci in količina za končni volumen reakcije 25 µl.	36
Preglednica 11: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in DGGE	37
Preglednica 12: PCR program, uporabljen pri pomnoževanju ITS regij	37
Preglednica 13: Snovi in količine, za pripravo 0 in 100-odstotne raztopine denaturacijskega gradienta.	38
Preglednica 14: Volumni 0 in 100-odstotne raztopine za pripravo denaturacijskega gradienta 25 % - 60 %.	38
Preglednica 15: Količina dodanega katalizatorja za polimerizacijo gela in skupni končni volumni posameznih raztopin.	38
Preglednica 16: Seznam sekvenciranih vzorcev ektomikorize na bukvi. Pri vzorcih, kjer smo na agaroznem gelu dobili več kot eno progo, smo posamezne proge označili. * označuje proge, ki smo jih izrezali iz gela in ponovno pomnožili s PCR reakcijo.	41
Preglednica 17: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 1 (SLO_IS_001_BU64_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	43
Preglednica 18: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 2 (SLO_IS_005_BU94_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	45
Preglednica 19: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 14 (SLO_IS_003_BU60_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	47
Preglednica 20: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 13 (SLO_IS_003_BU60_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	48
Preglednica 21: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 16 (SLO_IS_006_BU112_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	50
Preglednica 22: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 17 (SLO_IS_006_BU112_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	51
Preglednica 23: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 19 (SLO_IS_007_BU112_S) (preglednica 16), z bazami podatkov.....	53
Preglednica 24: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 6 (SLO_IS_011_BU30_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	55
Preglednica 25: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 11 (SLO_IS_011_BU30_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	56
Preglednica 26: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 7 (SLO_IS_012_BU7_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	58
Preglednica 27: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 21 (SLO_IS_012_BU7_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	59
Preglednica 28: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 8 (SLO_IS_013_BU107_S) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	61
Preglednica 29: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 9 (SLO_IS_014_BU109_S) (preglednica 16), z bazami podatkov.....	63
Preglednica 30: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 3 (SLO_IS_008_BU53_S) (preglednica 16), z bazami podatkov.....	66
Preglednica 31: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 5 (SLO_IS_010_BU45_J) (preglednica 16) z bazami podatkov.....	70

Preglednica 32: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorcev 10, 12, 18 in 15 (<i>SLO_IS_006_BU112_S</i> , <i>SLO_IS_007_BU112_S</i> , <i>SLO_IS_011_BU30_S</i> in <i>SLO_IS_012_BU7_S</i>) (preglednica 16), z bazami podatkov.....	71
Preglednica 33: Tipi ektomikorize in oznaka substratov, ki smo jih uporabili v analizi DGGE.	76

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Shematski prikaz enote v tandemskih ponovitvah jedrne ribosomalne DNK regije. Prikazana so mesta naleganja začetnih oligonukleotidov in smer pomnoževanja v PCR za začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili za pomnoževanje ITS regij pri določanju glive v ektomikorizi (povzeto po Grebenc, 2005: 14).	14
Slika 2: Mreža fenoloških postaj v Sloveniji. Na fenoloških postajah se opazujejo pojavi razvojnih fenoloških faz izbranih samoniklih (zelišča, trave, grmovnice in drevnine) in kmetijskih rastlin (posevki, sadno drevje in vinska trta) (Mreža fenoloških ... , 2010).	16
Slika 3: Spreminjanje temperature in svetlobe tekom dneva pri sadikah v poskusu 1 in 2 posajenih v komori pri 15-20° C.	21
Slika 4: Slika agaroznega gela po agarozni gelski elektroforezi. Pri petih vzorcih DNK smo po pomnoževanju s PCR reakcijo dobili več kot eno progo. Posamezne proge smo izrezali iz gela, ponovno pomnožili in sekvencirali. S primerjavno sekvenciranega dela rDNK z javno dostopno bazo podatkov GenBank (spletna stran NCBI, 18. mar. 2010), smo poskušali identificirati ali potrditi morfološko identifikacijo tipov ektomikorize.	40
Slika 5: Vzorec <i>SLO_IS_005_BU94_S</i> . a-Anatomija plašča: plektenhimatski tip E po Agerer (1987-2008) z značilno oblikovanimi krožnimi hifami. b- slika ektomikorize.	44
Slika 6: <i>Cenococcum geophilum</i> Fr. Slika plašča, zvezdasti tip G po Agerer (1987-2008).	46
Slika 7: <i>Peziza ostracoderma</i> . Anatomija plašča-tip E po Agerer (1987-2008) s posameznimi kratkimi segmenti.	49
Slika 8: <i>Leptodontidium orchidicola</i> . Slika tipa ektomikorize.	52
Slika 9: <i>Tuber</i> sp.1. a-Tip ektomikorize. B-cistidiji, ki izraščajo iz plašča	54
Slika 10: <i>Tuber</i> sp.2. a-Tip ektomikorize. B-anatomija notranjega sloja plašča: tip H po Agerer (1987-2008)	57
Slika 11: <i>Peziza ostracoderma</i> . a-Tip ektomikorize. b-Notranje plasti plašča pseudoparenhimatski, prehoden tip med tipom L in M po Agerer (1987-2008).	60
Slika 12: <i>Scleroderma areolatum</i> . a- Tip ektomikorize. b- rizomorf.	62
Slika 13: <i>Scleroderma areolatum</i> . a- Cistide tipa N po Agerer 1987-2008, različni tipi hif: napihnjena, granulirana in zožitve hif pred razvejanjem. b- Tip ektomikorize. c- Rizomorf in hife. V kvadratu je poudarjena povezava med hifami tipa b ₂ po Agerer (1987-2008).	65
Slika 14: Slika tpa ECM vzorca <i>SLO_IS_009_BU50_J</i> .	67
Slika 15: <i>Laccaria proxima</i> . a- Tip ektomikorize. b- Hife. Na sliki je s puščico označena septa z zaponkami.	69
Slika 16: Delež ektomikoriznih kratkih korenin glede na pregledane koreninske vršičke sadik bukve v pilotnem poskusu pri štirih različnih pogojih (povišana temperatura, 15-20° C brez dodatnega ohlajanja koreninskega sistema, 15-20° C z dodatnim ohlajanjem koreninskega sistema in kontrolni poskus, kjer so bile sadike izpostavljene zunanji temperaturi).	72
Slika 17: Deleži pojavljanja tipov ektomikorize na sadikah bukve v pilotnem poskusu. HebSac- <i>Hebeloma sacchariolen</i> s. SclAre- <i>Scleroderma areolatum</i> . LacPro- <i>Laccaria proxima</i> . Tub sp.- <i>Tuber</i> sp. PezOst- <i>Peziza ostracoderma</i> . CenGeo- <i>Cenococcum geophilum</i> . LepOrc- <i>Leptodontidium orchidicola</i> .	73
Slika 18: Deleži pojavljanja ektomikorize na sadikah bukve v kontrolnem poskusu in pri treh različnih temperaturni pogojih rasti. HebSac- <i>Hebeloma sacchariolen</i> s. SclAre- <i>Scleroderma areolatum</i> . LacPro- <i>Laccaria proxima</i> . Tub sp.- <i>Tuber</i> sp. PezOst- <i>Peziza ostracoderma</i> . CenGeo- <i>Cenococcum geophilum</i> . LepOrc- <i>Leptodontidium orchidicola</i> .	74
Slika 19: Primerjava pojavljanja tipov ektomikorize pri vitalnih in odmrlih sadikah bukve v pilotnem poskusu. n-število vitalnih/odmrlih sadik v pilotnem poskusu.	75
Slika 20: DGGE elektroforetska ločitev pomnožkov PCR iz izbranih vzorcev.	77
Slika 21: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve iz poskusa 1 (15-20°C brez hlajenja korenin).	79
Slika 22: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve iz poskusa 2 (15-20° C s hlajenjem korenin).	79
Slika 23: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve v poskusu 3 (povišana temperatura-rastlinjak).	80
Slika 24: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve v poskusu 4 (kontrola).	80
Slika 25: Spreminjanje fenofaze 1 na sadikah bukve v novem poskusu.	82
Slika 26: Spreminjanje fenofaze 3 na sadikah bukve v novem poskusu.	82
Slika 27: Spreminjanje fenofaze 5 na sadikah bukve v novem poskusu.	83

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

Tipi ektomikorize, ki smo jih določili po anatomsko morfološki metodi

PRILOGA B

Parametri za izdelavo dendrograma, ki smo jih za posamezno taksonomsko enoto izdelali s programom jModelTest 0.1

Priloga B1: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Laccaria* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

Priloga B2: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Peziza* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

Priloga B3: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Scleroderma* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

Priloga B4: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Leptodontidium* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected).

Priloga B5: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Tuber* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

PRILOGA C

Dendrogrami, ki smo jih konstruirali v programu PAUP 4.0B10, po metodi BioNJ.

Priloga C1: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Laccaria* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).

Priloga C2: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Peziza* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).

Priloga C3: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Scleroderma* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).

Priloga C4: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Leptodontidium* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).

Priloga C5: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Tuber* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).

PRILOGA D

Pojavljanje tipov ektomikorize na sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) v pilotnem poskusu pri štirih različni temperaturnih pogojih rasti

Priloga D1: Pojavljanje tipov ECM pri sadikah bukve, ki smo jih v pilotnem poskusu izpostavili temperaturi 15-20° C in kjer predel korenin nismo dodatno ohlajevali (poskus 1). V poskusu je 7 sadik odmrlo, 11 sadik je ostalo vitalnih. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*.

SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

Priloga D2: Pojavljanje tipov ECM pri sadikah bukev, ki smo jih v pilotnem poskusu izpostavili temperaturi 15-20° C z dodatno hlajenim predelom korenin (poskus 2). V poskusu je 15 sadik propadlo, 3 sadike so ostale vitalne. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

Priloga D3: Pojavljanje tipov ECM pri sadikah bukvic, ki so bile v pilotnem poskusu izpostavljene povišani temperaturi (poskus 3). V poskusu so se vse sadike propadle. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

Priloga D4: Pojavljanje tipov ECM pri poskusu 4 (kontrolni poskus) v sklopu pilotnega poskusa. V poskusu je 8 sadik odmrlo, 10 sadik je ostalo vitalnih. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ECM	Ektomikoriza
ARSO	Agencija Republike Slovenije za okolje
T _m	Temperatura denaturacije začetnega oligonukleotida
PCR	Verižna reakcija s polimerazo; angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Bp	bazni par
BLAST	Basic Logical Alignment Search Tool (orodje za iskanje osnovnih logičnih poravnav nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij)
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat(i)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Državni center za biotehnoške informacije)
DGGE	Poliakrilamidna elektroforeza v gradientu denaturantov; angl. <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
EDTA	Etilendiamin tetraocetna kislina; angl. <i>ethylenediaminetetraacetate</i>
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
μl	mikroliter
APS	amonijev persulfat
TEMED	N,N,N',N'Tetrametil-etilen-diamin
MHB	Bakterije v tleh, ki sodelujejo pri razvoju ektomikorize; angl. <i>Mycorrhiza Helper Bacteria</i>
CMN	Mikorizna mreža, ki jo tvori preplet hif mikoriznih gliv. Ektomikorizne glive, ki so vključene v preplet, tvorijo mikorizo s številnimi različnimi vrstami rastlin. Mikorizna mreža omogoča prenos ogljika in drugih hranil med različnimi gostiteljskimi rastlinami; angl. <i>Common Mycelial Network</i>

1 UVOD

Glive, ki tvorijo ektomikorizo z gozdnim drevjem, predstavljajo ključno povezovalno komponento med viri hranil ter simbiotskimi rastlinami in tako bistveno pripomorejo k delovanju ekosistema (Smith in Read, 2008). Za razumevanje delovanja in sledenje morebitnim spremembam v opazovanem gozdnem ekosistemu je nujno poznavanje vrstne sestave partnerjev v simbiozi (Kraigher, 1996). Spremembe v okolju, bodisi naravne ali kot posledica človekove dejavnosti, se lahko hitro odražajo pri makro- ali mikrosimbiontih, na primer pri glivah. V našem delu smo želeli ugotoviti vrste oziroma višje taksonomske skupine gliv, ki tvorijo ektomikorizo (ECM) na izbranih sadikah bukve v rizotronih in kako različne temperature v okolju vplivajo na pojavljanje in pestrost ektomikoriznih gliv na sadikah bukve.

Zastavljene raziskovalne probleme smo reševali s študijem pojavljanja tipov ektomikorize z različnimi pristopi: z anatomsko morfološko analizo tipov ektomikorize na koreninskih sistemih sadik bukve ter potrditev identifikacije znanih oziroma identifikacijo neznanih tipov ektomikorize z molekularnimi metodami in z izdelavo dendrogramov.

V sklopu diplomskega dela, smo želeli ugotoviti tudi, kako različne temperature v okolju vplivajo na stopnjo olistanja pri bukvi, zato smo na sadikah bukve popisovali fenofaze od marca do maja.

Delovne hipoteze

Pri svojem delu smo si zastavili naslednje hipoteze:

- Predvidevamo, da se bodo pri sadikah bukve, ki smo jih izpostavili različnim temperaturam, pojavljali različni tipi ektomikorize. Znano je, da motnje v ekosistemu lahko privedejo do sprememb v vrstni sestavi in številu tipov ektomikorize na območju, ki je pod stresom.

- Na osnovi dejstva, da različni pristopi pri ugotavljanju pestrosti ektomikorize pripeljejo do različnih rezultatov, smo na izbranih sadikah bukve ugotavljali pojavljanje tipov ektomikorize z več metodami: tipe ektomikorize na koreninah smo identificirali z anatomsko morfološko metodo, z molekularnimi pristopi in filogenetsko analizo.
- Predvidevamo, da bo pestrost ektomikorize največja pri sadikah bukve, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C. Znano je, da je optimalna povprečna temperatura za produktivnost in vitalnost bukve 8° C. Simbioza med dvema organizmoma bo najbolj optimalna, če bodo pogoji, v katerih uspevata oba simbionta, optimalni za vsakega od njiju.
- Predvidevamo, da bo dodatno hlajenje koreninskega sistema za 4-5° C pri sadikah, ki rastejo pri 15-20° C, vplivalo na sestavo združbe in pestrost ektomikorize vitalnih sadik bukve. Predvidevamo, da bo pestrost ECM, na koreninskih vršičkih sadik bukve, ki jih nismo dodatno hladili, večja.
- Pri sadikah bukve, ki so ostale vitalne, pričakujemo večjo pestrost ektomikorize, kot pri odmrlih sadikah.
- Predvidevamo, da se ektomikorizne glive nahajajo tudi v substratu, v katerem so posajene sadike bukve, pri katerih smo identificirali tipe ektomikorize. Z elektroforetsko metodo DGGE (Gelska Elektroforeza v Gradientu Denaturantov) smo želeli potrditi, da se tudi ektomikorizne glive, ki smo jih določili na koreninskih sistemih sadik bukev (*Fagus sylvatica* L.), pojavljajo v substratu, v katerem so sadike posajene.
- Na osnovi dejstva, da temperatura okolja vpliva na prekinitev dormance pri rastlinah in s tem na začetek prenosa asimilatov do različnih porabnikov, smo na sadikah bukve popisovali fenofaze olistanja. Predvidevamo, da bodo najprej olistale sadike, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi, sledile bodo sadike kontrolnega poskusa. Kot zadnje bodo olistale sadike, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C in dodatnem hlajenju koreninskega sistema.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKORIZA

Med različnimi komponentami organizmov, ki živijo v tleh, poteka širok nabor interakcij (na nivoju organizmov in populacij). Mnoge interakcije so kratkotrajne in posamične, spet druge so stabilne. V preglednici 1 so povzeti načini biotskih interakcij, ki so značilne za organizme, ki živijo v tleh (Killham, 1994).

Preglednica 1: Pregled odnosov med organizmi (biotskih interakcij) (povzeto po Killham, 1994: 63).

INTERAKCIJA

DEFINICIJA

SIMBIOZA

Odnos med dvema organizmoma ali dvema populacijama, ki je stabilen če ne prihaja do sprememb v okolju.

(1) Mutualizem

Oba partnerja imata korist.

(2) Protokooperacija

Oba partnerja imata korist, vendar sodelovanje ni nujno za njun obstoj.

(3) Neutralizem

Noben od obeh partnerjev nima koristi.

(4) Komenzalizem

Eden od partnerjev ima korist, medtem ko je drugi neprizadet.

(5) Antagonizem

V odnosu ima škodo eden ali oba partnerja.

(a) Kompeticija

Dve vrsti tekmuje za en omejujoč dejavnik v okolju.

(b) Amenzalizem

Ena vrsta v okolju je inhibirana s toksini, ki jih v okolje sprošča druga vrsta.

(c) Predatorstvo

Prehranjevanje organizmov (plenilec) z drugimi organizmi (plen) v okolju.

(d) Parazitizem

Organizem pridobiva hranilne snovi iz živega tkiva na račun drugega organizma.

(6) Sinergizem

Povezava pri kateri združena aktivnost presega stopnjo individualne aktivnosti.

Stalno simbiozo med koreninami in hifami je Frank leta 1885 imenoval mikoriza (gr. *mukes* – *gliva*, *rhiza* – *korenina*) in jo definiral kot glivno korenino, ki deluje kot organ za sprejemanje vode in hranil (Kraigher, 1996; Smith in Read, 2008). Mikoriza, ne korenine, je glavni organ za privzem hranil v rastline. Na osnovi te trditve lahko razložimo tudi razvoj prvih kopenskih rastlin, ki so imele slabo razvite prave korenine. Te so bile kolonizirane s hifami gliv, ki so tvorile vezikle in arbuskule podobne tistim, ki jih danes tvori arbuskularna mikoriza. Rečemo lahko, da je bila kolonizacija kopnih površin pogojena z razvojem simbiotskih organizmov (Smith in Read, 2008). Poznavanje mikoriznih tipov, njihove vrstne sestave in številčnosti, je nujno potrebno za razumevanje delovanja naravnih ekosistemov (Kraigher in sod., 1996).

2.2 OBLIKE MIKORIZE

Poznamo različne oblike mikorize (Smith in Read, 2008), ki jo delimo glede na način stika med glivo in rastlino ter specifičnega gostitelja: arbuskularno mikorizo, ektomikorizo, ektendomikorizo, arbutoidno mikorizo, monotropoidno mikorizo, erikoidno mikorizo ter orhidejsko mikorizo. V preglednici 2 so zbrani podatki o lastnostih posameznih oblik mikorize (Smith in Read, 2008; Read in sod. 2004).

Preglednica 2: Oblike mikorize s skupinami gliv, ki vstopajo v posamezno obliko, skupine rastlinskih partnerjev, izbrane značilnosti in splošno geografsko pojavljanje posamezne oblike. Povzeto po podatkih v Smith in Read, 2008: 5; Read in sod., 2004: 1245, Read, 1991.

	SKUPINE RASTLINSKIH PARTNERJEV	SKUPINE GLIVNIH PARTNERJEV	LASTNOSTI OBLIKE MIKORIZE	SPLOŠNA GEOGRAFSKA RAZPOREDITEV
ektomikoriza	golosemenke, kritosemenke	<i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> (<i>Glomeromycota</i>)	plašč hif na površini korenine, Hartigova mreža hif, ki prodirajo med celice primarne skorje do endoderma	zmerni in borealni gozdni ekosistemi
arbuskularna mikoriza	golosemenke, kritosemenke, nekateri praproti in mahovi; 80 % vseh kopenskih rastlin	<i>Glomeromycota</i>	tvorijo arbuskule (grmičke) znotraj celic primarne skorje gostiteljske rastline	zmerni in tropski travniški sistemi, tropski gozdovi, aridne in puščavske združbe
ektendomikoriza	golosemenke	<i>Ascomycota</i> in <i>Basidiomycota</i>	tvorijo intracelularne hife in Hartigovo mrežo	/
erikoidna mikoriza	<i>Ericales</i> , nekateri mahovi	<i>Ascomycota</i> (<i>Hymenoscyphus</i> in <i>Oidiodendron</i>)	klopčiči hif znotraj celic primarne skorje	borealni ekosistemi
arbutoidna mikoriza	<i>Arbutus</i>	<i>Basidiomycota</i>	klopčiči hif znotraj celic primarne skorje, lahko tudi plašč hif na površini korenine, Hartigova mreža	/
monotropoidna mikoriza	<i>Ericales</i> ; rastline brez klorofila	<i>Basidiomycota</i>	klopčiči hif znotraj celic primarne skorje, Hartigova mreža	/
orhidejska mikoriza	orhideje	<i>Basidiomycota</i>	značilno se pojavljajo propagule gliv v semenu rastlinskega partnerja in klopčiči hif znotraj celic primarne skorje korenin	/

Dve najpogostejši obliki mikorize v zmernem pasu sta ektomikoriza in arbuskularna mikoriza – endomikoriza (Smith in Read, 2008). Endomikorizo soustvarjajo neseptirane filamentne glive iz poddebla *Glomeromycotina* (vrste iz rodov *Endogene*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus*, *Sclerocystis*). Njihove hife lahko vstopajo v celice primarne skorje korenin, kjer lahko tvorijo spirale, grmičke (arbuskule) in vezikle. Prevladujoča oblika

endomikorize se imenuje arbuskularna mikoriza in se pojavlja pri večini (čez 90 %) vrst rastlin (Smith in Read, 2008).

V ektomikorizi (ECM) gliva oblikuje strukturo, imenovano plašč, ki obdaja korenine. Iz plašča izraščajo v substrat hife ali rizomorfi. Hife lahko prodirajo med celice primarne skorje, kjer tvorijo zapleten znotrajcelični sistem, imenovan Hartigova mreža (Smith in Read, 2008). Ta sega največ do meje endoderma, nikoli v celice endoderma ali mednje in v centralni cilinder. Glive, ki soustvarjajo to mikorizo, sodijo v poddebla Ascomycotina (npr. *Elaphomyces*, *Tuber*,...), Basidiomycotina (*Amanita*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Russula*, *Scleroderma*...) in Zygomycotina (*Endogone*) (Smith in Read, 2008). Približno 3 % vseh rastlin, predvsem gozdnih drevesnih vrst, je ektomikoriznih. Ektomikoriza nastopa pri vrstah iz družin *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae* idr.

Vsaka oblika mikorize je povezana z določenim ekosistemom in s talnim okoljem, ki se razlikuje glede hitrosti dekompozicije, mineralizacije, dostopnosti hranil in dinamike ekosistemov. Posamezne oblike mikorize so se razvijale vzporedno z razvojem ekosistemov (Read, 1991). Specifični klimatski in edafski pogoji v okolju so vplivali na klimazonalno razporeditev tako rastlin kot oblik njihove mikorizne simbioze.

Opazimo lahko, da se pojem mikoriza uporablja za poimenovanje mnogih simbiotskih povezav med glivami in rastlinami, zato je pomembno, da skušamo opredeliti, katere so tiste posebne lastnosti, ki v kombinaciji tvorijo mikorizo. Te so stalna oblika, razvoj in prisotnost v naravnih pogojih. Najbrž ima vsaka oblika mikorize svojo značilno funkcijo, zato pojem mikoriza ne pomeni, da imajo vse oblike nujno enako funkcijo oziroma, da vsaka povezava gliva-korenina tvori mikorizo (Smith in Read, 2008).

2.2.1 Funkcije mikorize

Povezave med glivami in rastlinami so v naravi prej pravilo kot izjema, zato obstajajo številne definicije, ki opisujejo značilnosti mikorize. En tip definicij opisuje mikorizo kot vsako povezavo med glivo in rastlino, ne glede na smer ali način oskrbovanja s hranilnimi

snovmi. Druge definicije ločujejo različne nivoje mikorize, kot na primer mikorizo, v kateri gliva oskrbuje rastlino s hranilnimi snovmi in mikorizo, kjer rastline od simbiotskih gliv ne dobijo hranilnih snovi (Smith in Read, 2008).

V naravi so ektomikorizne glive (ECM) koristne za rast in razvoj dreves. Zanje so koristne v mnogih pogledih, najpomembnejša je oskrba dreves s hranili, ki so slabo dostopni. Takšni so fosfor, nekatera hranila (Smith in Read, 2008) in dušik (Chalot in Brun, 1998). Drevesa vzajemno oskrbujejo glive s sladkorji in tako tvorijo odnos, ki mu pravimo mutualizem (Courty in sod., 2010; Smith in Read, 2008). Ektomikorizosfera, ki tvori zelo specifične intersticijske prostore med tlemi in koreninami dreves, je naseljena z velikimi in raznolikimi združbami mikroorganizmov (gliv in bakterij), ki med seboj delujejo spodbujajoče ali zavirajoče. Nekatere ektomikorizosferne bakterije konstantno spodbujajo razvoj mikorize in jih zato imenujemo tudi mikorizne pomožne bakterije (MHB) (Frey-Klett in Garbaye, 2005). ECM glive in bakterije ves čas sodelujejo tudi pri procesih preperevanja in raztapljanja (Uroz in sod., 2009).

Funkcije mikorize lahko opredelimo na morfološkem, fiziološkem in ekološkem nivoju (Kraigher, 1996). Na morfološkem nivoju lahko rečemo, da micelij mikoriznih gliv vpliva na tip razraščanja in razporeditve korenin v tleh, na večjo hitrost sprejemanja hranil na enoto površine ter na večjo dostopnost manjših kompartmentov v tleh. Micelij se razrašča na velikih površinah in razdaljah, kar omogoča dostopnost večjega volumna tal, večjo površino in dolžino absorpcijskih organov. Micelij gliv zmanjša transportno pot med korenino in tlemi. Plašč mikoriznih gliv lahko deluje kot mehanska prepreka pred vdorom patogenih organizmov in toksičnih elementov v tleh (Kraigher, 1996). Na fiziološkem nivoju je micelij mikoriznih gliv sposoben vezati mineralne snovi v tleh (Courty in sod., 2010; Paradi in Baar, 2006), sprejemati organsko vezane oblike hranil (N,P), shranjevati fosfate in druga hranila v glivnem plašču oziroma v veziklih arbuskularnih gliv, vezati ali selektivno sprejemati toksične ione težkih kovin, imobilizirati delovanje patogenih organizmov v plašču (Paradi in Baar, 2006) in izločati antibiotike v mikorizosfero (Kraigher, 1996). Micelij mikoriznih gliv ima velik pomen tudi na ekološkem nivoju. Preko micelija mikoriznih gliv je možen prenos hranil med osebki iste in različnih vrst v ekosistemu. Mikorizne glive sodelujejo pri časovni in prostorski razporeditvi hranil v

ekosistemu, hkrati pa vplivajo na raznolikost bioloških komponent v gozdnih tleh in celem ekosistemu (Kraigher, 1996). Mikorizne glive sodelujejo pri kroženju ogljika. Ogljik dobivajo v obliki asimilatov od gostiteljske rastline in iz organskega materiala v tleh (Courty in sod., 2010). Hife mikoriznih gliv tvorijo preplet, ki vključuje številne ektomikorizne glive različnih drevesnih vrst. Takšen preplet tvori skupno mikorizno mrežo (CMN), ki omogoča prenos ogljika in hranil med različnimi gostiteljskimi rastlinami (Simard in Durall, 2004). O pomenu skupne mikorizne mreže (CMN) v dinamiki skupnosti rastlin, poročajo mnogi avtorji (Newman 1988; Perry in sod. 1992; Amaranthus in Perry, 1994, cit. po Courty in sod., 2010).

Vplivi človeka in naravne spremembe lahko vplivajo na razvoj koreninskih vršičkov in s tem na razvoj ektomikorize. Zato lahko sklepamo, da je ektomikoriza kazalec sprememb v okolju (Cudlin in sod., 2007). Funkcionalna kompatibilnost in toleranca na stres je pri ektomikoriznih tipih vrstno specifična (Gianinazzi-Pearson, 1984, cit. po Kraigher, 1996). Na podlagi tega lahko struktura ektomikorizne združbe pripomore k razumevanju procesov v gozdnih ekosistemih, hkrati pa jo lahko uporabimo kot bioindikator za ugotavljanje onesnaženosti v gozdnih tleh (Kraigher in sod., 1996, 2007; Al Sayegh Petkovšek, 2004). Onesnaževanje lahko vpliva na distribucijo mikoriznih gliv, med katerimi lahko nekatere izginejo, medtem ko druge izkoristijo novo nastali manj kompetitivni stadij v zaradi onesnaženja osiromašenem gozdnem ekosistemu (Kraigher, 1996). *Cenococcum geophilum*, predstavnik ektomikorize in indikator stresa v gozdnih sestojih (LoBuglio, 1999), se pogosteje pojavlja v območjih s povečano koncentracijo ozona v zraku (Grebenc in Kraigher, 2007) in na območjih, kjer so rastline bolj izpostavljene svetlobi in povišani temperaturi (Železnik in sod., 2007). Grebenc in Kraigher (2007) dokazujeta tudi, da se pri povečanem prepihanju z ozonom, poleg vrste *Cenococcum geophilum*, podobno obnašajo še nekateri predstavniki ektomikoriznih tipov na bukvi, kot so *Russula ochroleuca*, *R. fellea*, *R. illota*, *Tuber puberulum*, *Lactarius sp.* in *Russula sp.*, medtem ko se nekateri tipi mikorize pojavljajo izključno samo na območjih s povišano koncentracijo ozona (*Fagihiza fusca*, *F. setifera*, *Lactarius acris*, *Piceirhiza nigra*). Na bolj senčnih območjih se kot partner v ektomikorizi pogosteje pojavlja *Genea hispidula* (Železnik in sod., 2007).

2.2.2 Vplivi podnebnih sprememb na funkcije ektomikoriznih gliv

Courty in sod. (2010) poročajo o spremenjenih funkcijah ektomikoriznih gliv z vidika podnebnih sprememb. Izpostavili so tri točke, ki bi lahko vplivale na ECM: vpliv na gostiteljsko rastlino (dvig atmosferskega CO₂ in segrevanje ozračja), indirektn vpliv na glivnega simbionta zaradi spremenjenega razporejanja ogljika iz rastlin (fotosinteza) in direkten vpliv na simbiotske glive (kot sta segrevanje in dostopnost vode). V večini primerov velja, da naštetih faktorji delujejo v povezavi, zato bi vpliv posameznega faktorja težko dokazali.

Segrevanje ozračja vpliva med drugim na povečan donos fotosinteze. Dodatni tok ogljikovih hidratov tako povečuje rast koreninskega sistema (Norby in Luo, 2004). Visoke temperature jeseni in pozimi povzročijo, da ektomikorizne glive tvorijo trosnjake z zamudo tako v tem letu, kot v naslednjem (Kausrud in sod., 2008). Malcolm in sod. (2008, cit. po Courty in sod., 2010) ugotavljajo, da se respiracija nekaterih ektomikoriznih gliv, kot so *Cenococcum geophilum*, *Suillus* sp. in *Lactarius* sp., zaradi povišanih temperatur zmanjša, kar je presenetljivo, saj bi pričakovali, da se respiracija poveča.

Povečana koncentracija CO₂ v ozračju poveča tok ogljika po rastlini do korenin (Janssens in sod., 2005), vpliva na spremenjeno dekompozicijo, strukturno sestavo in številčnost nekaterih vrst ektomikoriznih gliv v tleh (Fransson in sod., 2001, cit po Courty in sod., 2010), poveča respiracijo ECM gliv (Fransson in sod., 2007) in njihovo metabolno aktivnost (Chung in sod., 2006).

Med drugim tudi dostopnost vode (suša) vpliva na ECM glive. Rastline in ECM glive imajo številne mehanizme, s katerimi uravnavajo pomanjkanje vlage v tleh. Pomemben sistem, ki omogoča uspešen nadzor nad prehajanjem vode, tvori kontinuum med tlemi, micelijem, koreninami in prevajalnimi elementi v rastlini, do listnih rež in potem v zraku okoli le-teh (Mushin in Zwiazek, 2002). ECM glive različno vplivajo na vodni status v rastlinah. Znan je primer, da rastlina bolj pogosto razvije simbiozo s *C. geophilum* tam, kjer je nizek vodni potencial v tleh, kot s katero drugo glivo npr. *Lactarius subdulcis*, ker ji

ta predvidoma omogoča večjo možnost preživetja v času ekstremnih suš (di Pietro in sod., 2007; Paradi in Baar, 2006). Drevesa pomanjkanje vode rešujejo z zapiranjem rež in zmanjšano asimilacijo CO₂, kar vpliva tudi na manjši pretok ogljika do ECM gliv v koreninah. To lahko povzroči propadanje ECM gliv in velike spremembe v njihovi sestavi. Courty in sod. (2010) ugotavljajo tudi, da je bil do sedaj pomen ECM gliv v povezavi s klimatskimi spremembami nekoliko zapostavljen, in da bo v prihodnje potrebno narediti več študij v tej smeri.

2.2.3 Pestrost ektomikorize

Vsaka vrsta drevesa lahko tvori simbiotske povezave z več sto glivnimi vrstami, medtem ko lahko nekatere ECM glive tvorijo simbiozo z vsakim gostiteljskim organizmom, ki lahko tvori simbiotske povezave, spet druge so specifične za določen rod ali celo vrsto. Funkcionalna kompatibilnost, fiziologija in toleranca na različne stresne dejavnike je vrstno specifična. Zato je poznavanje ECM tipov, njihove vrstne sestave in številčnosti, nujno potrebno za razumevanje delovanja gozdnih ekosistemov (Kraigher in sod., 1996; Kraigher, 1999).

Ektomikorizo najpogosteje identificiramo na osnovi morfoloških, kemijskih in anatomskih lastnosti ektomikorizne korenine, glivnega plašča in Hartigove mreže (Kraigher, 1996) s primerjavo z že znanimi opisi iz literature. Le redko pa z uporabo te metode določimo glivnega partnerja do vrste (na primeru ektomikorize smreke glej Kraigher, 1996; Kraigher, 1997; na primeru bukve Brand, 1991; Grebenc, 2005), saj za številne vrste, ki domnevno tvorijo ektomikorizo, še ni ustreznih opisov. Zato danes za določanje kar največjega števila tipov ECM do vrste ali vsaj rodu izvajajo analize ITS regij v jedrni ribosomalni DNK (White in sod., 1990, cit. po Grebenc, 2005; Kraigher in sod., 1995; Grebenc, 2005; Courty in sod., 2010). Poleg jedrnih genov so posamezni raziskovalci v PCR pomnoževali tudi mitohondrijske gene (Glen in sod., 2001, cit po Grebenc, 2005).

Vrstna sestava, raznolikost in fiziologija mikoriznih gliv se razlikuje glede na sukcesijsko fazo gozdnih sestojev (Last in sod., 1987, cit. po Kraigher, 1996). Paradi in Baar (2006) sta

izvajala analizo pestrosti ECM na vrbi (*Salix* sp.) in sicer na treh ploskvah ob reki Waal (Nizozemska), z različno starostjo gozdov-10, 20 in 60 let. Analize so pokazale, da je največja pestrost ECM na 10 letnih vrbah, manjša na 20 letnih in najmanjša na 60 letnih vrbah. Ugotovila sta tudi, da je večji delež ECM gliv na območjih z nizko koncentracijo hranil in bazičnem pH prsti, ter da redke ECM glive lahko preživijo ostre spremembe pogojev, ki nastajajo zaradi poplav in suše.

Populacija ECM gliv je torej taksonomsko in funkcionalno zelo raznolika. Razlog za takšno raznolikost je tudi v tem, da so tla zelo heterogen habitat, ki se nenehno spreminja. Takšen habitat zahteva veliko različnih ekoloških niš, katerih prostorska ureditev se v času dinamično spreminja zaradi prilagajanja okolju (Courty in sod., 2010).

2.3 NAČINI IDENTIFIKACIJE GLIV V EKTOMIKORIZI

Za identifikacijo mikorizne glive s posameznim partnerjem je nujna prisotnost treh strukturnih komponent: plašč, ki obdaja koreninski vršiček, Hartigova mreža, ki se razrašča med epidermalnimi in kortikalnimi celicami ter izhajajoči elementi, ki tvorijo pomembne povezave s tlemi in s sporokarpom glive, ki tvori ECM (Smith in Read, 2008). Tipe ektomikorize lahko opisujemo z anatomo-morfološkimi metodami in z molekularnimi metodami. Anatomske metode so zelo zamudne, poleg tega je pri nekaterih tipih ektomikorize po anatomskih značilnostih nemogoče ugotoviti vrsto glive, mogoča je le določitev rodu ali širše skupine gliv s podobnimi anatomskimi značilnostmi – ektomikoriza je vegetativni organ, taksonomija višjih gliv pa sloni predvsem na anatomiji generativnih organov - trosnjakov, trosišč in trosov (Kraigher, 1996).

2.3.1 Določevanje ektomikorize na osnovi morfoloških in anatomskih struktur plašča

Že zgodaj se je pojavila težnja po klasifikaciji tipov ektomikorize, kar bi omogočilo enostavnejšo identifikacijo glive v partnerstvu. Za identifikacijo na osnovi morfoloških in

anatomskih struktur plašča se danes najpogosteje uporablja sistem, ki ga je zastavil Agerer (1991). Klasifikacija predvideva standardizirano fotografiranje novega tipa, opis morfoloških lastnosti tipa ektomikorize (tip razraščanja mikorize, značilnosti površine plašča, barva, izmere...) in izhajajočih elementov, analiza anatomije plašča (plektenhimatski, psevdoparenhimatski, vmesne in posebne oblike plašča in hif) in izhajajočih elementov (cistide, laticifere, rizomorfi), nekatere biokemijske reakcije in barvanje ter shranjevanje referenčnih preparatov in vzorcev (Kraigher, 1996). Slojevitost Hartigove mreže je pretežno pod vplivom rastlinskega partnerja, medtem ko zgradbo plašča pretežno določa vrsta glivnega partnerja in je zato pomembna informacija pri identifikaciji glive v ektomikorizi (Grebenc, 2005). Izhajajoče elemente (hife in rizomorfe) najdemo pri vseh znanih tipih ektomikorize bolj ali manj izražene, pomembni so za klasifikacijo in identifikacijo ECM (Agerer, 1991). Skupno je danes znanih okoli 420 znakov, v večini primerov gre za znake v več oblikah/stanjih, na osnovi katerih opišemo tip in ločimo med seboj dva različna tipa ektomikorize. Večji del znakov je zbran v atlasu in opisih za identifikacijo ektomikorize (Agerer, 1987-2008) in v interaktivni različici ključa za določevanje tipov ektomikorize DEEMY (Spletna stran programov DEEMY).

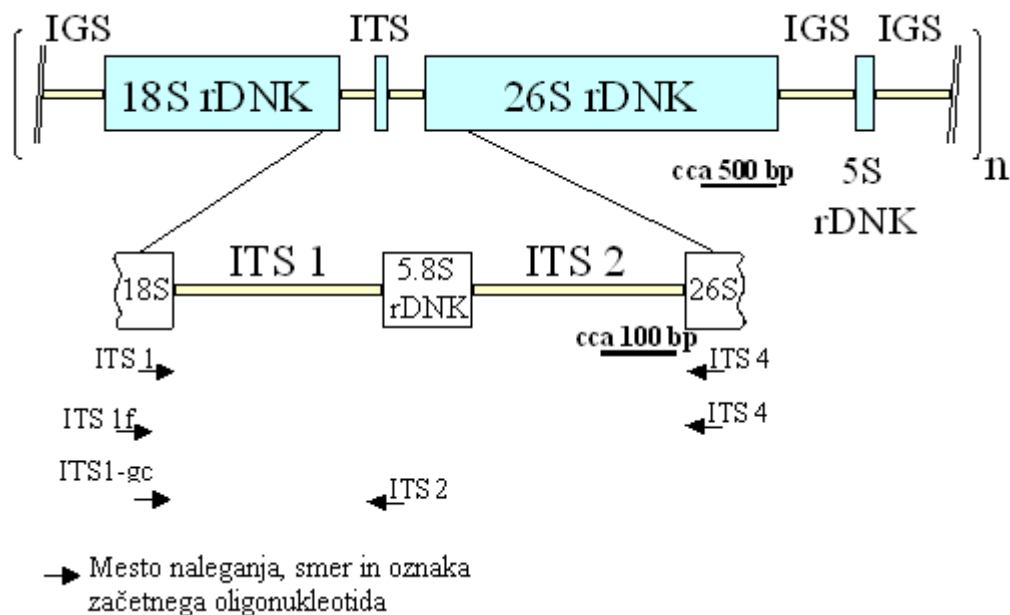
2.3.2 Identifikacija gliv v ektomikorizi z uporabo molekularnih markerjev

Pri identifikaciji tipov ektomikorize ter študiju pojavljanja vrst gliv v ektomikorizi uporabljamo nekaj pristopov, ki dajejo različno natančne podatke. Najpreprostejši pristop pri študiju populacije ektomikoriznih gliv je popisovanje trosnjakov ektomikoriznih vrst in rodov gliv na študiranem območju. Časovno in laboratorijsko zahtevnejše je ugotavljanje glivnega partnerja po anatomske metodi, predvsem pri večjem številu vzorcev (za potrebe ekoloških študij), ter uporaba molekularnih tehnik pri identifikaciji vrste glive v ektomikorizi (Grebenc, 2005).

Molekularne metode identifikacije ECM so zasnovane na uporabi encima DNK polimeraza *Taq*, s katerim se v primerni mešanici denaturirane DNK, nukleotidov, začetnih oligonukleotidov ("primerjev") in puferske raztopine po posebnem termičnem postopku lahko pomnožijo (amplificirajo) kratki segmenti glivne DNK (Kraigher, 1996; Bridge in

sod., 1998). Reakcija se imenuje verižna reakcija s polimerazo (PCR). Uporaba PCR je zelo razširjena v molekularni biologiji. Encimska reakcija omogoča pomnoževanje specifičnih DNK fragmentov iz kompleksnih vzorcev ter kloniranje, analizo in modifikacije raznih nukleinskih kislin. S pomočjo PCR lahko raziskujemo tudi zelo redke sekvence. Danes se je uporaba PCR razširila na različna področja mikologije, vključno z genetiko in sistematiko, ekologijo, talno mikrobiologijo, rastlinsko patologijo, mikologijo v medicini, biotehnologijo in mnoge druge (Bridge in sod., 1998). Poznamo več različic PCR reakcij, vendar v osnovi vse vključujejo tri korake - denaturacija DNK, naleganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje fragmentov DNK (Kraigher in sod., 1995; Bridge in sod., 1998; Paradi in Baar, 2006).

Za raziskovanje pestrosti organizmov v izbranem okolju s pomočjo PCR reakcije navadno uporabljamo začetne oligonukleotide, ki nalegajo na ustrezno ohranjena zaporedja zapisov za ribosomalne gene 26S rRNA, 18S rRNA ali vmesne, nekodirajoče ITS regije (slika 1). Omenjeni geni oziroma fragmenti DNK so prisotni v vseh organizmih (Kirk in sod., 2004). Nekodirajoče regije v rDNK se znotraj taksonomske vrste malo razlikujejo pri večini ektomikoriznih gliv in so zato primerne za ločevanje osebkov tudi na ravni vrste in rodov (Horton, 2002, cit po Grebenc, 2005). V kombinaciji s klasično anatomsko metodo (Agerer, 1987-2008) predstavljajo molekularne metode hiter in zanesljiv pripomoček pri študiju taksonomskih in ekoloških značilnosti mikorize (Kraigher, 1996).



Slika 1: Shematski prikaz enote v tandemskih ponovitvah jedrne ribosomalne DNK regije. Prikazana so mesta naleganja začetnih oligonukleotidov in smer pomnoževanja v PCR za začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili za pomnoževanje ITS regij pri določanju glive v ektomikorizi (povzeto po Grebenc, 2005: 14).

2.4 BUKEV

Bukev (*Fagus sylvatica* L.) je najbolj razširjena vrsta v zmernih listnatih gozdovih v Evropi. Različne vrste bukev se pojavljajo v vzhodni in zahodni Aziji, Evropi in Severni Ameriki (Fang in Lechowicz, 2006). Slovenija leži na jugovzhodnem delu osrednje Evrope in kar 1.185.145 hektarjev površin je poraščenih z gozdom, kar predstavlja 58,5 % celotne površine (Splošni podatki ... , 2010). Gozdovi se razraščajo na območju med 40 in 1900 m nadmorske višine. Največji delež gozdov se nahaja na hribovitih območjih (Poljanec in sod., 2010). Povprečna letna temperatura je 8° C, in sicer niha med 0° C v hribovitem svetu (Kredarica) in 14° C v nižinskem predelu (Portorož) Slovenije (Povprečne letne ... , 2010). Na območju Slovenije se količina padavin od zahoda proti vzhodu zmanjšuje, in sicer med 1.600 mm (Lesce) in 700 mm (Murska Sobota) (Skupne letne ... , 2010). Optimalni pogoji za uspešno produktivnost in vitalnost bukve so povprečna letna temperatura 8° C in več kot 800 mm padavin (Ebert, 1996, cit. po Grebenc, 2005). Velik

del Slovenije izpolnjuje omenjene pogoje, zato je temu primerno gosto poraščena z bukvijo (*Fagus sylvatica* L.).

2.4.1 Fenofaze

Mednarodna fenološka komisija US/IBP Phenology Committee je podala naslednjo sodobno definicijo fenologije kot znanstvene discipline: Fenologija je preučevanje časa pojavljanja periodičnih bioloških faz in vzrokov njihovega pojava, ob upoštevanju biotskih in abiotskih dejavnikov ter preučevanje medsebojnega odnosa faz znotraj ene ali več vrst. Preučevanje fenofaz oziroma rezultati raziskav v povezavi z zunanjimi in notranjimi dejavniki se lahko koristno uporabljajo na številnih področjih, kot sta kmetijstvo in okolje. Fitofenologija je veja fenoloških znanosti, ki preučuje sezonsko spreminjanje ritmov v rastlinah. Znanstveniki iščejo različne povezave med spreminjanjem ritma v rastlinah v naravnih ali umetnih pogojih in endogenimi ter eksogenimi dejavniki (Puppi, 2007).

Na ozemlju Slovenije je prva fenološka opazovanja pri opisu razvoja različnih rastlinskih skupin uporabil Scopoli (Fenologija ... , 2010). Od leta 1990 je v Sloveniji 61 fenoloških postaj (slika 2), ki so razporejene po regionalnem klimatskem ključu. Opazovanja potekajo na izbranih negojenih, splošno razširjenih zeliščih, travah, gozdnem drevju in grmičevju ter na izbranih gojenih kmetijskih rastlinskih vrstah. Pri fenoloških opazovanjih opazujemo izbrano rastlino in zabeležimo dan pojava opazovane fenološke faze (prvi poganjki, olistanje, cvetenje, prašenje, jesensko obarvanje in odpadanje listja ter različne vegetativne in generativne faze pri nekaterih poljskih posevkih in sadnem drevju). Podatki fenoloških opazovanj v Sloveniji se nahajajo v arhivu Urada za meteorologijo, Agencije Republike Slovenije za okolje in so predmet številnih raziskav, ki preučujejo fenološke faze in njihovo odvisnost od vremena (Fenologija ... , 2010).



Slika 2: Mreža fenoloških postaj v Sloveniji. Na fenoloških postajah se opazujejo pojavi razvojnih fenoloških faz izbranih samoniklih (zelišča, trave, grmovnice in drevnine) in kmetijskih rastlin (posevki, sadno drevje in vinska trta) (Mreža fenoloških ... , 2010).

2.4.2 Vpliv suše na bukev in ektomikorizo

Sušo, registrirano kot znižan vodni potencial listov (na bukvi), so primerjali s stopnjo mikorizacije korenin sadik v sušnih pogojih. Podatki so pokazali, da zmanjšana razpoložljivost vode ni značilno vplivala na naselitev korenin bukve z ektomikoriznimi glivami (merjeno s količino ergosterola), niti niso opazili spremembe števila tipov ektomikorize na koreninski sistem dreves v sušnem stresu. Je pa suša vplivala na vrstno sestavo združbe ektomikoriznih gliv na bukvi. Pri tem so opazili, da se različne vrste ektomikoriznih gliv različno odzivajo na sušo v smislu njihovega vzorca pojavljanja in številčnosti. Posledica suše je povečana abundanca mikorize bukve z vrsto *Xerocomus chrysenteron*. Natančne analize so pokazale kopičenje snovi v mikorizi, kot so saharoza, glukoza in fruktoze ter za glive specifične komponente kot sta manitol in arabitol v primeru, ko vodni potencial pade pod -1.96 MPa. Če bukev tvori mikorizo s *X. chrysenteron*, so opazili kopičenje arabitola, v primeru mikorize z *Lactarius subdulcis* pa kopičenje manitola (Shi in sod., 2002).

2.4.3 Tipi ektomikorize na bukvi

Trenutno je na bukvi opisanih najmanj 50 različnih tipov ektomikorize, z glivnimi partnerji iz rodov *Byssocorticium*, *Cenococcum*, *Cortinarius*, *Elaphomyces*, *Entoloma*, *Geastrum*, *Genea*, *Lactarius*, *Laccaria*, *Piloderma*, *Ramaria*, *Russula*, *Sphaerozone*, *Tomentella*, *Tomentellopsis*, *Tricholoma*, *Tuber*, *Xerocomus* in več tipov ektomikorize, katerih glivni partner ni znan. To so *Fagirhiza arachnoidea*, *F. cystidophora*, *F. fusca*, *F. globulifera*, *F. lanata*, *F. oleifera*, *F. pallida*, *F. setifera*, *F. spinulosa* in *F. vermiculiformis* (Agerer, 1987-2008, Spletna stran programa DEEMY, 2009).

Tipe ektomikorize na bukvi, na območju Slovenije sta opisala tudi Grebenc (2005) v naravnem in gospodarskem gozdu (Rajhenavski Rog in Snežna jama) in Al Sayegh Petkovšek (2001) v gozdnih rastiščih v Zavodnjah, Zasavju in Kočevski Reki. Opisala sta ektomikorizne glive iz rodov *Cenococcum*, *Cortinarius*, *Piceirhiza*, *Russula*, *Fagirhiza*, *Genea*, *Tomentella*, *Thelephora*, *Lactarius*, *Scleroderma*, *Amphinema*, *Tricholoma*, *Entoloma* in *Hebeloma*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kompleti

- Komplet za ekstrakcijo DNK: Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Frankfurt, Nemčija)
- Komplet za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela: Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, ZDA)
- Komplet za izolacijo DNK iz prsti: Power Soil DNK Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA)

3.1.2 Puferske raztopine

Ime	Sestava
Pufer TBE 0,5 x	0,045 M Tris-borat 0,001 M EDTA, pH 8.0
Pufer TAE 1 x	0,02 M Tris acetat 0,001 M EDTA, pH 8.0

3.2 METODE

3.2.1 Pilotni poskus kot vir izhodnega materiala za analize ektomikorize

Iz Drevesnice Omorika, Muta smo dobili puljenke bukve. Puljenke so v Drevesnici nabrali maja 2007, na provenienci Temenjaki (Preška), vzgojna oblika P1, iz slovenskega predalpskega provenienčnega območja (GSO 4.0175). Puljenke, vodene kot puljenke +1, so bile eno leto posajene v Drevesnici Omorika, Muta. Spomladi 2009, smo jih v okviru raziskovalne naloge posadili v steklene kasete-rizotrone, dimenzij 2 x 30 x 50 cm. Do jeseni je večji del sadik v kasetah odmrl (t.i. stari/pilotni poskus). Predvidevamo, da so bile sadike bukve, ki smo jih sadili v kasete, prevelike in so že odganjale. Poleg tega je bil tretma pred sajenjem neustrezen, ker sadik nismo takoj posadili v substrat. Le-te so čakale

na analize koreninskega sistema. Zato smo novembra (18. in 19.11.2009) zastavili nov poskus z manjšimi - enoletnimi sadikami bukve. Sadike smo prav tako dobili iz Drevesnice Omorika, Muta. V Drevesnici so semena pridobili iz provenience Osankarica, vzgojna oblika 1/0, GSO 2.0019. Koreninski sistem odmrlih sadik smo uporabili za analizo mikorize. Prisotnost mikorize smo analizirali tudi na sadikah bukve v novo zastavljenem poskusu, enkrat v času novembra, decembra 2009. Spomladi, od 5.3.2010 do 19.5.2010, smo pri novih sadikah popisovali tudi fenofaze.

V drevesnici Omorika so pred sajenjem semena zemljo tretirati z Basamidom. Basamid se uporablja za zatiranje nematodov na sadikah, v rastlinjakih in kalilnikih. Na ta način zemljo razkužimo, odstranimo glive, bakterije, seme plevela in insekte. Seme so novembra 2008 v vrsticah posadili v zemljo. Seme je bilo strojno pokrito z zemljo, del semen so pokrili z žagovino. Grede so nato povaljali. Predel, kjer je bilo seme prekrito z žagovino, so zaščitili z mrežo. Spomladi 2009 so sadike bukve prekrili s kovertanom, ki sadike zaščiti pred pozebo.

3.2.1.1 Sajenje sadik v kasete-rizotrone in priprava substrata

Koreninski sistem sadik bukve smo pred sajenjem v kasete previdno oprali pod tekočo vodo. Nato smo predel korenin skenirali s skenerjem (EPSON Perfection V700 PHOTO, Indonezija) v programu WinRhizo[®]. Sadike smo označili. Oznaka vsebuje prvi dve črki besede bukev – BU in zaporedno številko od 1 do 132. Iz posameznih sadik smo med skeniranjem in označevanjem naključno odvzeli nekaj koreninskih vršičkov z mikorizo. Tipe mikorize smo določili kasneje.

Sadike smo posadili v kasete. V vsako kaseto smo posadili po eno sadiko. V vsak poskus smo vključili po 18 kaset (18 sadik), ki smo jih zložili v posebna stojala za kasete, ki jim pravimo tudi zabojniki. Za sajenje smo uporabili posebej pripravljen pasteriziran substrat. Pri sajenju smo pazili, da smo koreninski sistem čim manj poškodovali.

V kaseti si od dna navzgor sledijo kremenčev pesek, substrat in perlit. Kremenčev pesek na dnu kasete služi za drenažo. Pesek smo pred poskusom sprali z vodo. Substrat služi kot vir hranil in mineralov za rastline, hkrati pa je to mesto, kjer se razraščajo korenine. Substrat je bil pridobljen na vrtu Gozdarskega inštituta Slovenije, presejan in pasteriziran pri 80° C, 3 ure. Eno tretjino substrata je predstavljal vermikulit, ki smo ga zmešali v substrat za zagotavljanje boljšega zračenja v predelu korenin in zadrževanja vlage. Perlit je v tanki plasti nameščen nad substratom. Njegova vloga je bila zadrževanje vlage.

3.2.1.2 Opisi poskusnih pogojev

1. POSKUS - V KOMORI Z REGULACIJO TEMPERATURE

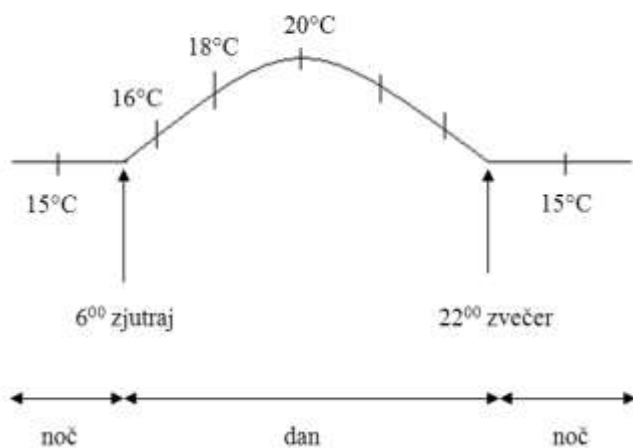
Sadike bukve pilotnega poskusa so posajene v kasete (1 sadika na kaseto). Po 18 kaset smo zložili v stojala za kasete (zabojnik). Tekom dneva se avtomatsko spreminja temperaturo zraka v komori (slika 3). Ponoči je temperatura zraka v komori 15°C, čez dan se dviguje do 19-20°C in zvečer spet pade na 15°C. V komori avtomatsko reguliramo svetlobo. Pri tem upoštevamo, da je poleti dan dolg 16 ur, noč pa 8 ur (Napoved za..., 2010). Jeseni postopoma krajšamo dan in daljšamo noč. Tako spreminjamo razmerje od 8:16, 12:12, 11:13 do 14:10 (noč:dan). V komori je umetna svetloba. Sadike pilotnega poskusa, so bile avtomatsko kapljično zalivane. Čez sezono smo zalivali po 2,5 dl na kaseto 3-krat tedensko. Vlage v substratu nismo merili. Jeseni smo poskus prekinili, ker je velik del sadik propadel. Zastavili smo nov poskus s 17 sadikami bukve, pri katerem veljajo enaki pogoji temperature in svetlobe. Zalivanje ni avtomatsko, temveč sadike zalivamo ročno. Čez zimo smo zalivali 1,5 dl na 14 dni, v prehodnem času od zime do poletja (april, maj) 1,5 dl na 7 dni in junija 1,5 dl na 2-3 dni. Pri poskusu 1 smo merili količino vlage v substratu v mV. Od decembra do začetka marca smo vlago merili ročno s sondo. Povprečna vlaga na globini 10 cm je bila 500 mV (14 %). Od marca do začetka junija smo vlago v substratu merili avtomatsko, na globini 15 do 20 cm. Od aprila do konec maja je bila povprečna vlaga 440 mV (13 %), v začetku junija pa 190 mV (5 %).

2. POSKUS - V KOMORI Z REGULACIJO TEMPERATURE IN HLAJENJEM KORENINSKEGA SISTEMA

V poskusu 2 (pilotni poskus) smo posadili 18 sadik v kasete. Kasete smo postavili v zabojnik v komori. Pogoji za svetlobo in zalivanje so bili v poskusu 2 so enaki pogojem v poskusu 1. Tudi temperatura zraka se je tekom dneva avtomatsko spreminjala kot v poskusu 1 (slika 3). Poleg temperature zraka pri tem poskusu smo uravnavali še temperaturo v predelu korenin. Temperatura v tem delu je bila za približno 5° C nižja od temperature zraka. Medtem ko je voda tekla po ceveh od agregata do komore, se je njena temperatura zaradi temperature okolja spreminjala. Končno znižanje temperature hladilne vode v predelu korenin je bilo 10° C, oziroma je nihalo med 8 in 12° C.

Jeseni smo zastavili nov poskus (novi/pilotni poskus) z novimi sadikami, ker je veliko sadik pilotnega poskusa odmrlo. V kasete smo posadili 17 sadik, ki smo jih izpostavili enakim pogojem (temperatura, svetloba), kot so bile sadike pilotnega poskusa. Zalivanje je bilo ročno po enakem postopku, ki je opisan pri novem poskusu v poskusu 1.

POLETI:



Slika 3: Spreminjanje temperature in svetlobe tekom dneva pri sadikah v poskusu 1 in 2 posajenih v komori pri 15-20° C.

3. POSKUS- POVIŠANA TEMPERATURA V STEKLENJAKU

Pri tem poskusu smo rastline izpostavili temperaturno delno reguliranim pogojem v steklenjaku. Stojalo z 18 sadikami pilotnega poskusa smo postavili v rastlinjak, kjer lahko poleti temperatura okolice naraste tudi do 50°C. Sadike so rastle pri dnevni svetlobi. Zalivanje sadik je bilo avtomatsko, kapljično regulirano. Poleti smo sadike zalivali 3-krat na teden po 2,5 dl na kaseto. Ker so vse sadike poskusa 3 propadle, smo jeseni posadili v kasete nove sadike (17 sadik). Za nove sadike so veljali enaki temperaturni in svetlobni pogoji, kot za sadike pilotnega poskusa. Zalivanje sadik je bilo ročno. Pozimi smo zalivali 1,5 dl na 14 dni, spomladi (april, maj) po 1,5 dl na 7 dni in junija po 1,5 dl na 2-3 dni. Pri tem poskusu smo opazovali vpliv visokih temperatur na rast bukve in razvoj ektomikorize.

4. POSKUS-KONTROLA

Za kontrolni poskus smo rastline pilotnega poskusa izpostavili zunanji temperaturi zraka. Stojalo z 18 sadikami smo postavili pod južni napušč lope, ki je postavljena ob gozdu na vznožju Rožnika. Sadike so delno zasenčene pred direktno svetlobo z živo mejo na južni strani ob stojalu. Sadike so rastle na dnevni svetlobi. Zalivali smo jih z avtomatskim sistemom, 3-krat na teden po 2,5 dl na kaseto. Jeseni smo posadili v kasete nove sadike, ker je veliko sadik pilotnega poskusa odmrlo. Posadili smo 17 sadik. Vsi pogoji rasti so ostali enaki, spremenili smo le način zalivanja iz avtomatskega na ročni. Pozimi smo zalivali po 1,5 dl na 14 dni, spomladi (april, maj) po 1,5 dl na 7 dni in od junija naprej po 1,5 dl na 2-3 dni.

3.2.1.3 Pogoji za rast

3.2.1.3.1 Temperature zraka

Sadike v obeh poskusih smo izpostavili različnim temperaturam. Poskusa 1 in 2 sta potekala v zaprti komori z temperaturo zraka 15-20° C. Pri sadikah v poskusu 1 smo dodatno hladili koreninski sistem na 10° C ± 2° C. Voda, ki je ohlajala predel korenin je

prihajala iz agregata (Omega air). Poskus 3 je potekal v rastlinjaku, kjer so temperature zraka poleti dosegle do 50° C. Poskus 4 je bil kontrolni poskus na prostem, z ekspozicijo v polsenčni legi.

Temperature zraka v komori (poskus 1 in 2) in v rastlinjaku (poskus 3) smo tekom poskusa merili z avtomatskim merilcem Voltcraft® DL-120 TH. Temperature zraka pod lopo nismo posebej merili, temveč smo za podatek navedli povprečne temperature zraka v Ljubljani (povprečne letne..., 2010; ARHIV-Dnevni..., 2010). Podatki o povprečnih temperaturah zraka so zbrani v preglednici 3.

Preglednica 3: Povprečne temperature zraka pri posameznem poskusu, merjene v sklopu novega poskusa.

Poskus	Obdobje meritev	Povprečna temperatura [° C]
1 in 2	21. 5. 09 - 5. 11. 09	18,63
	6. 11. 09 - 18. 5. 10	16,26
3	21. 5. 09 - 5. 11. 09	23,66
	6. 11. 09 - 18. 5. 10	15,32
4	21. 5. 09 - 5. 11. 09	18,25
	6. 11. 09 - 18. 5. 10	7,04

3.2.1.3.2 *Povprečne temperature izmerjene v substratu v posameznem poskusu*

Pri novem poskusu smo merili tudi temperaturo substrata. Temperaturo v substratu smo merili kontinuirano na 30 minut, na globini 2 cm in 20 cm. Podatke o temperaturi je zapisoval Data Logger, uredili smo jih v programu BoxCar® Pro 4.3. Podatke o povprečnih temperaturah v substratu smo uredili v preglednici 4. V pilotnem poskusu nismo izvajali meritev v substratu.

Preglednica 4: Povprečne temperature izmerjene v substratu v kasetah novega poskusa

Poskus	Globina meritve [cm]	Povprečna temperatura [° C]	
		27.11.09-8.4.10	9.4.10-18.5.10
1	2	14,44	15,25
	20	13,88	14,93
2	2	12,57	13,10
	20	10,45	10,72
3	2	11,52	15,0
	20	11,51	14,98
4	2	14,44	15,25
	20	13,88	14,93

3.2.1.3.3 Svetloba

Pri poskusu 1 in 2 v komori avtomatsko reguliramo dnevno-nočni ritem. Pri tem smo upoštevali, da je pozimi dan krajši in poleti daljši. Temu primerno smo urejali nastavitve na avtomatu. Sadike iz obeh poskusov so bile izpostavljene umetni svetlobi. Sadike v poskusih 3 in 4 so bile izpostavljene naravnem dnevno-nočnem ritmu oziroma naravni dnevni svetlobi.

Intenziteto svetlobe pri sadikah novega poskusa v rastlinjaku, komori in pod lopo, smo izmerili enkrat, s kvantnim PAR tipalom LICOR 190 SR. Izvedli smo točkovno meritev, ki nam pove intenziteto sevanja v posameznem poskusu, ob določenem času pri določenih pogojih, zato na podlagi izmerjenih podatkov ne moremo sklepati o spreminjanu svetlobe tekom dneva. Meritve je izvedel dr. Matjaž Čater, na dan 9. 6. 2010, ob 11¹⁰. V komori smo meritev ponovili dvakrat. Povprečna intenziteta svetlobe je bila $90 \pm 5 \mu\text{mol/m}^2 \text{s}^{-1}$. V času meritev v rastlinjaku smo imeli raztegnjena senčila, ki so zmanjševala intenziteto svetlobe. Rezultat meritve s PAR senzorjem je bil $50 \pm 3 \mu\text{mol/m}^2 \text{s}^{-1}$. Meritve pod lopo

smo izvedli 5-krat. S senzorjem smo se pomikali za 10-15 cm vzdolž zabojnika s kasetami. Povprečje meritev je bilo $120 \pm 20 \mu\text{mol/m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Meritev intenzitete svetlobe pri sadikah pilotnega poskusa nismo izvajali.

3.2.1.3.4 *Povprečna vlaga v substratu*

Pri pilotnem poskusu smo imeli urejen avtomatski kapljični način zalivanja sadik pri vseh štirih poskusih. Tekom sezone so bile sadike zalivane 3-krat tedensko (ponedeljek, sredo in petek) po 2,5 dl na eno kaseto. Vlage v substratu nismo merili.

V novem poskusu smo sadike zalivali ročno. V zimskem času (december do april) smo zalivali 1,5 dl na 14 dni, v pred-spomladanskem in spomladanskem času (april, maj) po 1,5 dl na 7 dni in junija po 1,5 dl na 2 do 3 dni. Od decembra 2009 do aprila 2010 smo pred zalivanjem izmerili vlago v substratu pri vsakem od štirih poskusov. Idealna vlaga v tleh v naravi v času rastne dobe je 25 % oziroma okrog 860 milivoltov (mV). Vlago smo od novembra do začetka aprila v poskusih 3 in 4, merili ročno s sondo ECH₂O[®] EC5 Moisture (Decagon devices) v milivoltih (mV) na globini 10 do 15 cm. Od aprila naprej koncentracije vlage nismo več spremljali. Za poskus 1 in 2, smo vlago merili avtomatsko na 30 minut, na globini 10 do 15 cm. Podatke o vlagi je zapisoval hranilnik podatkov. Uredili smo jih v programu Terminal v1,9b[©]. Podatki o vlagi v substratu so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Povprečne izmerjene vlage v substratih v posameznem poskusu (novi poskus) merjene ročno s sondo ECH₂O[®] EC5 Moistu (Decagon devices) in avtomatsko, v milivoltih (mV) na globini od 10 do 15 cm.

Poskus	Obdobje meritve	Način meritve	Izmerjena vlaga [mV]	Izmerjena vlaga [%]
1	27.11.09-8.4.10	Avtomatsko	308	8,95
	9.4.-18.5.10	Avtomatsko	341	9,90
2	27.11.09-8.4.10	Avtomatsko	569	16,53
	9.4.-18.5.10	Avtomatsko	642	18,66
3	15.12.09-5.3.10	Ročno	305	8,85
4	15.12.09-5.3.10	Ročno	299	8,70

3.2.1.3.5 Relativna zračna vlažnost

V rastlinjaku (poskus 3) in v komori (poskusa 1 in 2) smo poleg temperature zraka kontinuirano merili tudi relativno zračno vlažnost z avtomatskim merilcem Voltcraft[®] DL-120 TH. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: relativna zračna vlažnost zraka v komori in rastlinjaku, merjena v času novega poskusa.

Poskus	Obdobje meritve	Relativna zračna vlažnost [%]
1 in 2	21.5. do 5.11.2009	68,11
	6.11. do 18.5.2010	76,26
3	21.5. do 5.11.2009	57,17
	6.11. do 18.5.2010	53,23

3.2.1.4 Spremljanje fenofaz na bukvi

Fenofaze na bukvi je popisovala Jana Janša dvakrat na teden od 5. marca 2010 do 19. maja 2010, vse dokler se listi na posamezni rastlini niso popolnoma razvili (faza 5). Popisovali smo samo razvoj listov. Posamezne faze smo označili s številkami 1, 3 in 5. Faza 1

pomeni, da je bukev še v fazi dormance, listni popki so rjave barve, zaprti in majhni. Faza 3 pomeni, da so se popki že podaljšali in nabrekli. Lahko so že vidni listi, ki pa še niso razviti oziroma so še v listnem ovoju. V zadnji, 5 fazi so prvi listi že povsem zlezli iz listnega ovoja in se razprli. Listna ploskev je popolnoma vidna, prav tako je vidna listna baza.

3.2.2 Vzorčenje, čiščenje in določevanje tipov ECM

3.2.2.1 Odvzemanje koreninskih vršičkov za določevanje tipov ECM

Koreninski sistem sadik smo skenirali s skenerjem (EPSON Perfection V700 PHOTO) v programu WinRhizo[®]. Pri odmrlih sadikah smo kompletne koreninske sisteme sadik pregledovali pod stereo lupo (Olympus, SZX12, vir svetlobe Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlobo). Če smo opazili prisotnost ECM na korenini, smo ta del mikorizne koreninice odrezali in ga shranili v petrijevki z vodo.

Dele korenin z ECM smo odvzeli tudi iz še rastočih, vitalnih sadik v kasetah, enkrat v času od novembra do decembra 2009. Posamezno kaseto s še rastočo sadiko smo vzeli iz zabojnika za kasete, jo odprli na eni strani in iz koreninskega sistema odrezali mikorizne koreninice, ki smo jih opazili s prostim očesom. Do nadaljnjih analiz smo jih shranili v petrijevkah z vodo.

Koreninskega sistema novih sadik, ki smo jih sadili novembra 2009, nismo pregledovali pod stereo lupo, ker bi to vzelo preveč časa. Sadike smo morali namreč čimprej posaditi v substrat, da so bili koreninski sistemi sadik čim krajši čas izpostavljeni zraku. Zato smo korenine z ECM odvzeli med skeniranjem pri tistih sadikah, kjer smo opazili prisotnost ECM ob skeniranju s prostim očesom.

3.2.2.2 Shranjevanje in čiščenje koreninskih vršičkov

Petrijevke z vzorci smo do določevanja tipov ECM shranili v hladilniku na 4° C. Ostanke substrata na mikoriznih korenincah smo med določevanjem tipov ECM odstranili s pomočjo čopiča in pincete. Med pregledovanjem smo odvzeli od 4 do 10 koreninskih vršičkov z ECM za ekstrakcijo in za DGGE. Za ekstrakcijo smo odvzeli vsaj 2 mm dolge koreninske vršičke, ki smo jih shranili v epruvetah (1,5 ml) s 400 µl ekstrakcijskega pufra AP1.

Od korenin odmrlih sadik bukve smo pobrali koreninske vršičke, dolge od 0,5-1 cm, za DGGE. Vzorčili smo s pomočjo stereo lupe v veliki stekleni petrijevki z vodo. Posamezno rastlino oziroma njen koreninski del smo položili v petrijevko in s pomočjo pincete ter skalpela odrezali od 4-10 koreninskih vršičkov. Koreninske vršičke smo izbrali naključno po čim večjem predelu korenin. Posamezne koreninske vršičke smo odlagali na suh papir in jih s pinceto prenesli v epruvete (1,5 ml). Epruvete (1,5 ml) smo označili z zaporedno številko iz seznama. Koreninske vršičke smo shranili na -85°C za DGGE.

Poleg koreninskih vršičkov iz odmrlih sadik smo pobrali tudi koreninske vršičke iz sadik pilotnega poskusa posajenih spomladi 2009, ki so še rastle. Posamezno kaseto smo vzeli iz stojala za kasete in jo položili na mizo. Z nožem smo na eni strani kasete prerezali lepilni trak, da smo lahko odprli eno stran kasete. Nato smo previdno s pomočjo pincete in skalpela odrezali od 4-10 koreninskih vršičkov, ki so bili dolgi od 1-2 cm in jih shranili v epruvete (1,5 ml), ki smo jih označili z enako številko kot jo ima sadika bukve. Če je bil substrat zelo namočen in so bili koreninski vršički umazani od substrata, smo substrat odstranili s pomočjo čopiča. Epruvete (1,5 ml) smo zložili v škatlo in shranili v zamrzovalni omari na -85°C za DGGE.

3.2.3 Identifikacija ektomikorize

Tipe ektomikorize smo določevali po anatomskih in morfoloških lastnostih glede na objavljene opise (Agerer, 1987-2008; Spletna stran programov DEEMY, 2009) po

metodologiji, opisani v Kraigher (1996). Izbrane tipe ektomikorize, identificirane po anatomsko-morfološki metodi ter neidentificirane tipe ektomikorize smo uporabili v molekularnih analizah.

3.2.3.1 Določevanje tipov ECM na osnovi morfoloških in anatomskih struktur plašča

Anatomske in morfološke lastnosti smo opisovali na podlagi objavljenih opisov po Agerer (1987-2008) in s pomočjo interaktivne različice ključa za določevanje tipov ektomikorize DEEMY (spletna stran programov DEEMY). Tipe ECM smo opazovali s stereo lupo (Olympus, SZX12, vir svetlobe Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlobo) in mikroskopa (Olympus, BX51, povečava 100-2000x). Izbrane tipe ektomikorize in anatomske preparate smo digitalizirali z digitalno kamero DP12-Olympus (pritrjena neposredno na mikroskop ali lupo) in slike shranjevali ter obdelovali s programom NIS - Elements[®] BR 3,0.

Za vsak tip ECM smo s pomočjo stereo lupe določili način razraščanja, obliko, premer in dolžino osi, površino, obarvanost in prisotnost izhajajočih elementov (rizomorfov in hif). S pomočjo mikroskopa smo določili anatomijo notranjega in zunanjega sloja plašča ter anatomijo izhajajočih elementov.

Na izbranih vzorcih tipov ektomikorize smo za opis in identifikacijo uporabili barvno reakcijo s sulfovanilinom. Test smo izvajali na izoliranih delih plašča in na rizomorfih. Spremembe barve smo opazovali makroskopsko (pod lupo) in mikroskopsko. Mešanice reagentov, pripravo testa in odčitavanje rezultatov smo izvedli, kot je opisano v Agerer (1991).

3.2.3.2 Identifikacija gliv v ektomikorizi z uporabo molekularnih markerjev

3.2.3.2.1 Ekstrakcija DNK

DNK ektomikoriznih gliv smo izločili s kompletom za ekstrakcijo DNK (Dneasy Plant Mini Kit, Quiagen) po navodilih proizvajalca, v kombinaciji z navodili za ekstrakcijo DNK po SOP LABFIGE GIS (ekstrakcija DNK-Qiagen_modificirano):

Pred začetkom ekstrakcije preverimo naslednje pogoje:

- Vsi postopki centrifugiranja se izvajajo pri sobni temperaturi (15-25°C)
- Vodno kopel segrejemo na 65°C
- Pufer AP1 in AP3/E smo predhodno segreli v vodni kopeli (65°C), da se morebitni precipitat raztopi
- Ali je pufri AW in AP3/E dodan etanol

1. V epruvete (1,5 ml) se odpipetira 400 µl pufra AP1
2. Posamezen mikorizni tip se odstrani od ostalih tipov in se ga da v mikrocentrifugirke s pufrom. V mikrocentrifugirke se da toliko mikoriznih vršičkov, da se jih vidi s prostim očesom, sicer bo premalo materiala za izolacijo.
3. S pomočjo mikro pestila se stre mikorizne vršičke.
4. Centrifugira se nekaj sekund, da se ves material zbere na dnu mikrocentrifugirke.
5. Doda se 4 µl Rnase A, vrtinči in inkubira v vodni kopeli najmanj 10 minut (največ 60 min).
6. Doda se 130 µl pufra AP2, vrtinči in inkubira 15 min na ledu (v zamrzovalniku).
7. Centrifugira se 5 min na 20.000 x g.
8. Označi se QIAshredder Mini mikrocentrifugirke (2 ml) in vanje odpipetira supernatant. Pri tem ne pipetiramo usedline.
9. Centrifugira se 2 min na 20.000 x g.

10. Označi se nove mikrocentrifugirke (1,5 ml) in vanje odpipetira supernatant. Doda se 1.5x volumen pufru AP3/E in premeša s pipeto.
11. Zavrže se QIAshredder Mini mikrocentrifugirke (2 ml).
12. Označi se Dneasy Mini mikrocentrifugirke (2 ml) in vanje odpipetira 600 µl mešanice iz koraka 10.
13. Centrifugira se 1 minuto pri maksimalni hitrosti ($\geq 20\,000 \times g$). Tekočino v mikrocentrifugirki se zavrže in mikrocentrifugirke uporabi ponovno.
14. Ponovi se korak s preostalo mešanico iz koraka 10.
15. Kolone s filtrom se postavi v mikrocentrifugirke (uporabi stare) in doda 500 µl pufru AW (vsebovati mora etanol).
16. Centrifugira se 2 minuti na maksimalni hitrosti.
17. Supernatant se zavrže, del kolone s filtrom se prenese v nove mikrocentrifugirke, ki se jih prej označi.
18. Doda se 250 µl pufru AW in centrifugira 2 minuti na maksimalni hitrosti.
19. Del kolone s filtrom se prenese na nove označene mikrocentrifugirke (1.5 ml).
20. Doda se 100 µl pufru AE (segret na 65°C) in inkubira pri sobni temperaturi 5 minut.
21. Centrifugira se 1 minuto pri maksimalni hitrosti.
22. Doda se 100 µl AE pufru in inkubira na sobni temperaturi 5 minut.
23. Centrifugira se 1 minuto pri maksimalni hitrosti.
24. Del tubice s filtrom se zavrže. Pri tem tekoča faza ne sme pljuskniti po filtru.
25. Preveri se, če so tubice z ekstraktom DNK pravilno označene: E09/73_1 (E-ekstrakcija, 09-leto izvajanja ekstrakcije, 73-zaporedna številka ekstrakcije, 1-zaporedna oznaka iz lista za ekstrakcijo. Pod to zaporedno številko je napisana šifra mikorize.)

Pri centrifugiranju smo uporabljali centrifugo, ki ima funkcijo hlajenja. Temperatura centrifuge je bila 23°C.

3.2.3.2.2 Pomnoževanje DNK

S polimerazno verižno reakcijo smo pomnoževali ITS1, ITS2 in 5,8S rDNK regije v genomu višjih gliv (slika 1). V reakcijsko mešanico (preglednica 7) smo dodali začetna

oligonukleotida ITS1f in ITS4 ali ITS1 in ITS4 (preglednica 8) in ekstrahirano DNK. Reakcije pomnoževanja smo izvedli na GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), po programu iz preglednice 9 (SOP 1-molekularna identifikacija, LABFIGE, GIS). Pri vzorcih mikorize, ki niso bili ponovno pomnoženi (reamplifikacija) po izrezovanju iz agaroznega gela, smo v reakcijsko mešanico dodali po 6 µl DNK. Za vzorce, ki smo jih po izrezovanju iz agaroznega gela očistili in ponovno pomnožili s PCR reakcijo (reamplifikacija), smo v reakcijsko mešanico dodali po 1 µl DNK.

Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje v PCR, sestavine, proizvajalci in količina za končni volumen reakcije 25 µl.

	Proizvajalec	Količina (µl)
10x PCR Gold Buffer	Roche	2,5
GeneAmp®dNTP (2 mM)	Applied Biosystems	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	Roche	2,5
oba začetna oligonukleotida (10µM)	Invitrogen	0,8 vsakega
polimeraza AmpliTaq Gold® (5 enot na µl)	Roche	0,2
Raztopina ekstrahirane DNK		1,0-6,0
sterilna destilirana voda	Gibco	do 25 µl
Končni volumen PCR		25 µl

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in sekvenčni reakciji

Oznaka	Nukleotidno zaporedje	Tm (°C)	Vir
ITS1-F	5' –CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A– 3'	55	http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tour/primers.html
ITS1	5' –TCC GTA GGT GAA CCT GCG G– 3'	57	http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tour/primers.html
ITS4	5' –TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC– 3'	53	http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tour/primers.html

Preglednica 9: PCR program za pomnoževanje ITS regij.

začetna denaturacija		5 min/95°C
15 ciklov	denaturacija	35 sek./95°C
	naleganje zač. oligonukleotidov	55 sek./55°C
	podaljševanje DNK verige	45 sek./72°C
15 ciklov	denaturacija	35 sek./95°C
	naleganje zač. oligonukleotidov	55 sek./55°C
	podaljševanje DNK verige	120 sek./72°C
10 ciklov	denaturacija	35 sek./95°C
	naleganje zač. oligonukleotidov	55 sek./55°C
	podaljševanje DNK verige	180 sek./72°C
končno podaljševanje		10 min/72°C
hranjenje vzorcev do uporabe		4°C

3.2.3.2.3 Ločevanje z agarozno gelsko elektroforezo

Za ločevanje PCR pomnožkov smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo po navodilih SOP1-molekularna identifikacija, LABFIGE, GIS. Gele smo pripravili s segrevanjem ustrezne količine agaroze LE Agarose, Analytical Grade (Promega Corporation, U.S.A.) v 0,5-kratnem pufru TBE (Tris-Borat-EDTA, Sigma). Uporabljali smo 1,5-odstotne (w/v) agarozne gele. Polimerizacija je potekala pri sobni temperaturi. Elektroforetsko ločevanje je potekalo 90 minut v 0,5-kratnem pufru TBE pri napetosti 150 V, 5 V/cm. Po končani elektroforezi smo gele barvali 15 minut v raztopini etidijevega bromida (Bio-Rad) koncentracije 0,5 µg/ml in jih nato spirali 15 minut pod tekočo vodo v banjici. Gele smo pregledovali v transiluminatorju Gel Doc EQ System, PC (Bio-Rad, Italy) pod UV lučjo (302 nm). Slike smo obdelovali s programskim paketom za zajemanje in obdelavo slike Quantity One[®] 4.4.1 (The Discovery Series, Bio-Rad).

3.2.3.2.4 Izrezovanje PCR pomnožkov iz agaroznega gela

Pri določenih vzorcih smo po pomnoževanju (PCR) lahko dobili več pomnožkov različnih dolžin. PCR pomnožke smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo v 1,5-odstotnem gelu pri napetosti 150 V, 120 minut. Gel smo barvali v etidijevem bromidu in spirali pod tekočo vodo v banjici. Na presevniku (Mini-transilluminator, Bio-Rad) smo s sterilnim skalpelom izrezovali proge pomnožkov ustreznih dolžin in jih osamili s kompletom za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, PROMEGA) po navodilih proizvajalca. Pri vzorcih, kjer smo na agaroznem gelu dobili več kot eno progo, smo izrezane proge očistili in posamezne proge ponovno pomnožili (reamplificirali). V sekvenciranje smo skupno poslali 21 vzorcev DNK (preglednica 16).

3.2.3.2.5 Sekvenciranje in sekvenčna analiza DNK

Kljub temu, da smo nekaj vzorcev uspeli določiti do vrste po anatomsko morfološki metodi, smo za vse vzorce tipov ektomikorize sekvencirali pomnožke z enakimi pari začetnih oligonukleotidov (ITS1F/ITS4 ali ITS1/ITS4) ITS regije v genomski rDNK, s katerimi smo že v osnovi izvedli PCR. Vzorce DNK smo poslali v komercialni sekvenčni laboratorij (Macrogen inc., Seul, Republika Koreja). Sekvenciranje DNK je potekalo v obe smeri (bidirectional sequencing).

Dobljene kromatograme po sekvenciranju smo ročno analizirali s programom FinchTV 1.4. Tako dobljena zaporedja smo primerjali s podatki v spletni bazi podatkov GenBank (Spletna stran NCBI, 2010) s programom "BLASTn" (spletna stran programov BLAST, 2010) namenjenim iskanju podobnih zaporedij v bazi z algoritmom iskanja in primerjave kratkih motivov nukleotidnih zaporedij. Rezultate primerjav smo prikazali v tabelah in jih vključili v kratke opise tipov ektomikorize. Od parametrov podobnosti smo prikazali odstotek podobnosti iskanega zaporedja z najboljšimi zadetki v bazi, ki je tudi najbolj neposredno uporabna vrednost, ter delež vrzeli med primerjanima zaporedjema.

3.2.3.3 Identifikacija gliv v ektomikorizi z izdelavo dendrogramov

Urejene sekvence izbranih PCR pomnožkov smo med seboj primerjali s programom MEGA 4.1 (Multiple Sequence Alignment Program, version 4.1) in MAFFT (Multiple Sequence Alignment Program, online version 6) (Spletna stran programov MAFFT, 2010). Filogenetske odnose smo ugotavljali z metodo največjega verjetja (»maximum likelihood«). S programom jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008; Guindon in Gascuel, 2003) smo poiskali najbolj optimalen model nukleotidnih substitucij glede na popravljeni Akaikejev kriterij informativnosti (AICc). Izbrani model smo uporabili za izdelavo filogenetskih dreves po metodi BioNJ (neighbor-joining) (Gascuel, 1997) s programom PAUP 4.0B10. Statistične podpore posameznih cepitev smo izračunali z neparametričnim testom vezanja (»bootstrap«) (Felsenstein, 1985) s po 2000 ponovitvami.

3.2.4 Sledenje prisotnosti ektomikoriznih gliv v vzorcih substrata

Tipe ektomikorize, ki smo jih našli na mikoriznih korenincah v koreninskih sistemih enoletnih in večletnih sadik in ki smo jih določili z anatomsko-morfološkimi ter molekularnimi metodami, smo želeli poiskati tudi v združbi mikroorganizmov v substratu, v katerem so bile posajene sadike bukvic.

3.2.4.1 Odvzemanje vzorcev substrata

Vzorci substrata smo odvzeli iz tistih kaset, v katerih so bile sadike z razvitim mikoriznim sistemom. Substrat, v katerem so bile večletne sadike, ki so tekom poskusa odmrle, smo zavrgli, zato za določene tipe ECM nimamo vzorcev substrata. Vzorce substrata smo odvzeli le iz kaset z vitalnimi sadikami. Substrat smo odvzeli iz šestih kaset in sicer tistih, v katerih so rastle sadike, ki so imele razvit mikorizni sistem. Substrat smo odvzeli s pomočjo 20 cm tulca s premerom 1 cm, ki smo ga potisnili ob rastlini globoko v substrat. Zemljo, ki se je ujela v tulec smo stresli na petrijevko, ki smo jo primerno označili. Vzorce substrata smo sušili v sterilizatorju st-06 (Instrumentaria, Zagreb) 48 ur na 50° C.

3.2.4.2 Ekstrakcija DNK iz zemlje

Vzorci substrata smo najprej homogenizirali v 50 ml epruvetah (Centrifuge tubes) (TPP®, Švica). Substrat smo homogenizirali s pomočjo sterilnih kovinskih krogel na stresalniku Vibromix 204 EV (Tehtnica, Slovenija). S pomočjo kompleta za izolacijo DNK iz zemlje (Power Soil DNK Isolation Kit, MO BIO) smo po navodilih proizvajalca ekstrahirali DNK iz 0.25 g vzorca substrata.

3.2.4.3 Pomnoževanje DNK

S polimerazno verižno reakcijo smo pomnoževali ITS1, del 28S rDNK na začetku in 5,8S rDNK na koncu regije v genomu višjih gliv (slika 1). V reakcijsko mešanico (preglednica 10) smo dodali začetna oligonukleotida ITS1-gc in ITS2 (preglednica 11) in ekstrahirano DNK iz vzorcev substrata. DNK, izolirano iz vzorcev substrata, smo pred pomnoževanjem 5-krat redčili. Redčitve DNK smo uporabili zaradi inhibitorjev, ki se nahajajo v tleh. V reakcijsko mešanico smo dodali po 1 µl 5-kratne redčitve DNK za posamezen vzorec. Reakcije pomnoževanja smo izvedli na GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), po programu iz preglednice 12. Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

Preglednica 10: Reakcijska mešanica za pomnoževanje v PCR, sestavine, proizvajalci in količina za končni volumen reakcije 25 µl.

	Proizvajalec	Količina (µl)
10x PCR Gold Buffer	Roche	2,5
GeneAmp®dNTP (2 mM)	Applied Biosystems	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	Roche	2,5
oba začetna oligonukleotida (10 µM)	Invitrogen	0,8 vsakega
polimeraza AmpliTaq Gold® (5 enot na µl)	Roche	0,2
Raztopina ekstrahirane DNK		6,0
sterilna destilirana voda	Gibco	9,7 (do 25 µl)
Končni volumen PCR		25 µl

Preglednica 11: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in DGGE

Oznaka	Zaporedje baznih parov	Tm (° C)	Vir
ITS1-gc	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT CCG TAG GTG AAC CTG CGG - 3'	57	Marko Bajc po Gardes in Bruns, 1993
ITS2	5' - GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC - 3'	57	http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tou r/primers.html

Preglednica 12: PCR program, uporabljen pri pomnoževanju ITS regij

začetna denaturacija		5 min./95°C
38 ciklov	denaturacija	45 sek./94°C
	naleganje zač. oligonukleotidov	45 sek./56°C
	podaljševanje DNK verige	90 sek./72°C
končno podaljševanje		10 min/72°C
hranjenje vzorcev do uporabe		4°C

3.2.4.4 Ločevanje vzorcev z DGGE

S pomočjo gelske elektroforeze v gradientu denaturantov (DGGE) smo želeli primerjati tipe ektomikorize na koreninskem sistemu z združbo mikroorganizmov v substratu. Analize smo naredili za tri različne vrste, *Tuber* sp., *Peziza ostracoderma* in *Scleroderma areolatum*. Za elektroforetsko ločitev pomnožkov smo uporabili DCode™ System (Bio-Rad, ZDA). Za nanašanje vzorcev smo uporabili 2-krat nanašalni pufer z glicerolom (Loading Buffer). Elektroforeza je tekla v 8-odstotnem poliakrilamidnem gelu (akrilamid/bis-akrilamid 37,5:1) z 1-krat TAE pufrom pri 60° C in 75 V 16 ur. Denuracijski gradient je bil 25 % (1,75M Urea, 10 % formamid) – 60 % (4,2M Urea, 24 % formamid) (preglednici 13 in 14). Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 minut v 1-kratni raztopini barvila SYBR Gold (SYBR® Gold nucleic acid gel stain, Invitrogen, USA). 10,000-kratno založno raztopino barvila smo redčili z elektroforetskim pufrom 1-krat TAE. Po barvanju smo gele spirali 1 minuto v 1x TAE. pH raztopine z barvilom in destilirane vode je bil 7,6. Gele smo pregledovali v transiluminatorju Gel Doc EQ System,

PC (Bio-Rad, Italy) pod UV lučjo (302 nm). Za slikanje smo uporabili digitalni fotoaparat EOS 500D (Canon, Japonska), za obdelavo slik na računalniku pa priložen program EOS 500D SD Version 20,0.

Preglednica 13: Snovi in količine, za pripravo 0 in 100-odstotne raztopine denaturacijskega gradienta.

	100 %	0 %
40 % AA/bis-AA 37,5:1	2.8 ml	4,6 ml
50xTAE	280 µl	460 µl
Glicerol	280 µl	460 µl
Formamid	5,6 ml	/
Urea	5,886 g	/
MQ H ₂ O	Do 14,0 (=0,785) ml	Do 23,0 (=17,48) ml

Preglednica 14: Volumni 0 in 100-odstotne raztopine za pripravo denaturacijskega gradienta 25 % - 60 %.

	100 %	0 %	Σ
25 % (Lo)	3,75 ml	11,25 ml	15,0 ml
60 % (Hi)	9,00 ml	6,00 ml	15,0 ml
Σ	12,75 ml	17,25 ml	

Gele smo vlivali v dveh stopnjah: gradientni del in krovni del (0 %), v katerega vstavimo glavnik. Pred vlivanjem gela dodamo v 60 % in 25 % mešanico katalizatorja (preglednica 15), ki sprožijo polimerizacijo. Ko vlijemo gel, počakamo 30 minut, da se deloma strdi, nato na vrhu dolijemo krovni gel (»Cover« gel), kateremu prej dodamo katalizatorje (preglednica 15). Ko je krovni gel vlit, med plošči vstavimo glavnik.

Preglednica 15: Količina dodanega katalizatorja za polimerizacijo gela in skupni končni volumni posameznih raztopin.

	APS (10 %)	TEMED	Σ
25 % (Lo)	125,0 µl	5,2 µl	15,0 µl
60 % (Hi)	125,0 µl	5,2 µl	15,0 µl
0 % krovni gel	57,5 µl	5,75 µl	5,75 µl

3.2.5 Predstavitve rezultatov

Podatke o pojavljanju tipov ECM na sadikah bukve in spreminjanje fenofaz smo uredili v programu Microsoft Office Excel 2007. Za prikaz tipov ECM v pilotnem poskusu v štirih različnih poskusih smo uporabili 2D-tortni grafikon. S pomočjo 100 odstotno naloženega 2D-paličnega vrstičnega grafikona smo prikazali deleže pojavljanja tipov ECM na sadikah bukve v pilotnem poskusu skupaj in posamič za vsak poskus posebej. Enak grafikon smo uporabili za predstavitev podatkov, kjer smo primerjali pojavljanje tipov ECM na vitalnih in odmrlih sadikah bukve iz pilotnega poskusa. 100 odstotno naložen 3D-stolpični grafikon smo uporabili za predstavitev podatkov spreminjanja fenofaz pri sadikah bukve v posameznem poskusu. Spreminjanje posameznih fenofaz (faze 1, 3, 5) smo za vse štiri poskuse skupaj predstavili na raztresenem grafikonu z ravnimi črtami in oznakami.

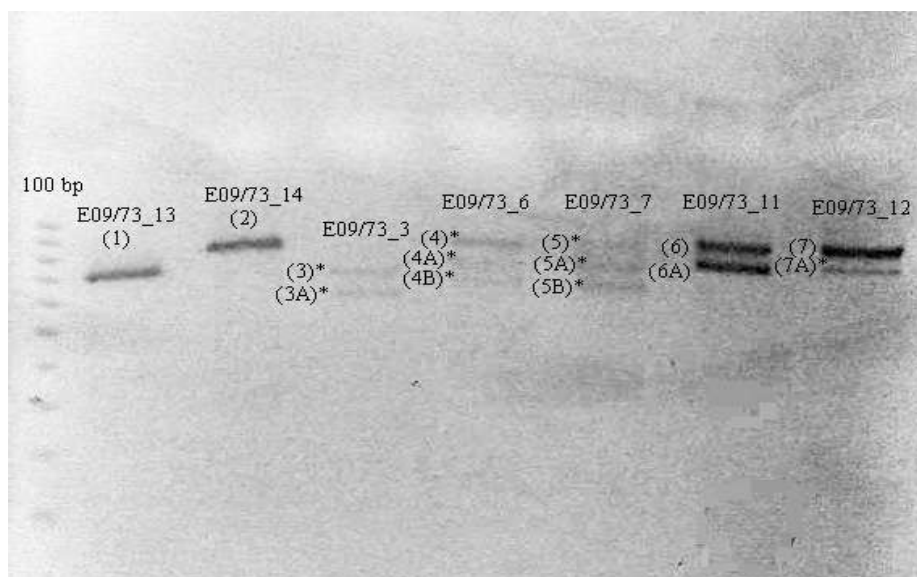
V preglednice smo uredili rezultate primerjav z nukleotidnih zaporedij vzorcev, ki smo jih poslali v sekvenciranje, z bazami podatkov GenBank in podatke za pestrost ECM za posamezen poskus.

4 REZULTATI

4.1 TIPI EKTOMIKORIZE NA BUKVI

4.1.1 Kratki opisi tipov ECM

Na vseh pregledanih sadikah bukvic smo s pomočjo morfološko-anatomske metode (Agerer, 1987-2008) opisali 12 tipov ektomikorize (priloga 1). Do vrste smo uspeli določiti en tip ECM (*Cenococcum geophilum*). Nadaljevali smo z molekularnimi metodami določanja tipov ECM. S pomnoževanjem segmentov DNK tipov ektomikorize, ki smo jih določili po morfološko-anatomske metode (Agerer, 1987-2008) s polimerazno verižno reakcijo, smo pri petih vzorcih ekstrahirane DNK na agarozni gelski elektroforezi, dobili več kot eno progo (slika 4).



Slika 4: Slika agaroznega gela po agarozni gelski elektroforezi. Pri petih vzorcih DNK smo po pomnoževanju s PCR reakcijo dobili več kot eno progo. Posamezne proge smo izrezali iz gela, ponovno pomnožili in sekvencirali. S primerjavno sekvenciranja dela rDNK z javno dostopno bazo podatkov GenBank (spletna stran NCBI, 18. mar. 2010), smo poskušali identificirati ali potrditi morfološko identifikacijo tipov ektomikorize.

Preglednica 16: Seznam sekvenciranih vzorcev ektomikorize na bukvi. Pri vzorcih, kjer smo na agaroznem gelu dobili več kot eno progo, smo posamezne proge označili. * označuje proge, ki smo jih izrezali iz gela in ponovno pomnožili s PCR reakcijo.

ZaporeDNK št. vzorca	Oznaka vzorca	Oznaka proge (angl. band)
1	SLO_IS_001_BU64_S	
2	SLO_IS_005_BU94_S	
3	SLO_IS_008_BU53_S	
4	SLO_IS_009_BU50_J	
5	SLO_IS_010_BU45_J	
6	SLO_IS_011_BU30_S	
7	SLO_IS_012_BU7_S	
8	SLO_IS_013_BU107_S	
9	SLO_IS_014_BU109_S	
10	SLO_IS_011_BU30_S	6
11	SLO_IS_011_BU30_S	6A
12	SLO_IS_012_BU7_S	7
13	SLO_IS_003_BU60_S	3*
14	SLO_IS_003_BU60_S	3A*
15	SLO_IS_006_BU112_S	4*
16	SLO_IS_006_BU112_S	4A*
17	SLO_IS_006_BU112_S	4B*
18	SLO_IS_007_BU112_S	5*
19	SLO_IS_007_BU112_S	5A*
20	SLO_IS_007_BU112_S	5B*
21	SLO_IS_012_BU7_S	7A*

4.1.1.1 SLO_IS_001_BU64_S

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavno
Oblika:	kroglasta
Površina:	gladka, sijoča
Dolžina:	do 1 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 1 – 2 mm
Obarvanost:	snežno bela
Obarvanost apeksa:	snežno bela
Izhajajoči elementi:	nismo opazili

Anatomija plašča:

Zunanji sloj:	plektenhimatski tip po Agerer (1987-2008)
Notranji sloj:	plektenhimatski tip po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	nismo opazili
Rizomorfi:	nismo opazili
Cistide:	nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S-spomlad)

Molekularne metode: S polimerazno verižno reakcijo smo pomnožili DNK in jo sekvencirali. S primerjavo ITS1-5.8S rDNK-ITS2 regije rDNK ribosomalne regije v rDNK z javno dostopno bazo podatkov GenBank (spletna stran NCBI, 18. mar. 2010), smo poskušali identificirati ali potrditi morfološko identifikacijo tipa ektomikorize. Rezultate

primerjav z bazo podatkov - tri najbližje zadetke s parametri podobnosti, akcesijami v bazi GenBank in komentarjem smo zbrali v preglednici 17.

Preglednica 17: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 1 (*SLO_IS_001_BU64_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 1 (<i>SLO_IS_001_BU64_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	707
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzi
Najbližji zadetki	AY312985.1	<i>Hebeloma sacchariolens</i>	1276	0,0	659/673 (97 %)	11/673 (1 %)
	GU328547.1	Uncultured <i>Basidiomycota</i> clone	1254	0,0	690/730 (94 %)	15/730 (2 %)
	EU668235.1	Uncultured <i>Hebeloma</i>	1250	0,0	686/726 (94 %)	12/726 (1 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov je sekvenca glive, ki se uvršča v vrsto <i>Hebeloma sacchariolens</i> . Na podlagi drugega zadetka, <i>Basidiomycota</i> , v katerega uvrščamo tudi <i>H. sacchariolens</i> in tretjega najbližjega zadetka, je po podobnosti nukleotidnega zaporedja tip najsorodnejši vrsti <i>H. sacchariolens</i> .						

4.1.1.2 SLO_IS_005_BU94_S

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavna
Oblika:	ukrivljena
Površina:	groba s posameznimi skupki substrata, ki dajejo svetlikajoč videz
Dolžina:	do 6 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,18-0,20 mm
Obarvanost:	oker do rjava barva
Obarvanost apeksa:	enaka

Izhajajoči elementi: nismo opazili

Anatomija plašča:

Zunanji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008).

Notranji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008).

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: nismo opazili

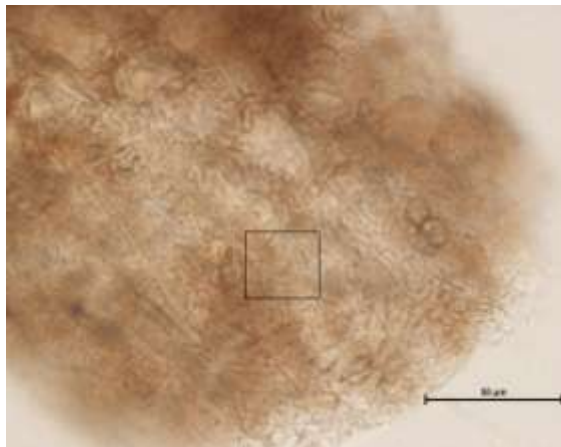
Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



a



b

Slika 5: Vzorec *SLO_IS_005_BU94_S*. a-Anatomija plašča: plektenhimatski tip E po Agerer (1987-2008) z značilno oblikovanimi krožnimi hifami. b- slika ektomikorize.

Molekularne metode: Rezultate primerjav z bazo podatkov - tri najbližje zadetke s parametri podobnosti, akcesijami v bazi GenBank in komentarjem smo zbrali v preglednici 18.

Preglednica 18: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 2 (*SLO_IS_005_BU94_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 2 (<i>SLO_IS_005_BU94_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	575
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	HM036629.1	Fungal sp.	1076	0,0	542/543 (99 %)	1/543 (0,2 %)
	AJ875393.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene (partial)	770	0,0	507/513 (98 %)	17/602 (2 %)
	GU055682.1	Uncultured <i>Hypocreales</i> clone	586	6e-147	481/584 (82 %)	28/584 (4 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov potrjuje, da je sekvencirana DNK gliva. Tretji zadetek jo uvršča v red <i>Hypocreales</i> in sicer med vzorce iz okolja. Sklepamo, da vzorec 2 ni ECM.						

4.1.1.3 SLO_IS_003_BU60_S (*Cenococcum geophilum* Fr.)

Opis: Agerer in Gronbach (1988)

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje: enostavno
Oblika: ravna
Površina: groba, svetleča
Dolžina: do 1,0 mm
Premeri osi: premer glavne in stranskih osi 0,15-0,17 mm
Obarvanost: temno rjava, črna
Obarvanost apeksa: temno rjava, črna
Izhajajoči elementi: hife

Anatomija plašča:

Zunanji sloj: zvezdasti, tip G po Agerer (1987-2008)

Notranji sloj: zvezdasti, tip G po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: številne hife, prisotne v zgornji tretjini ECM kjer izraščajo pravokotno na ECM

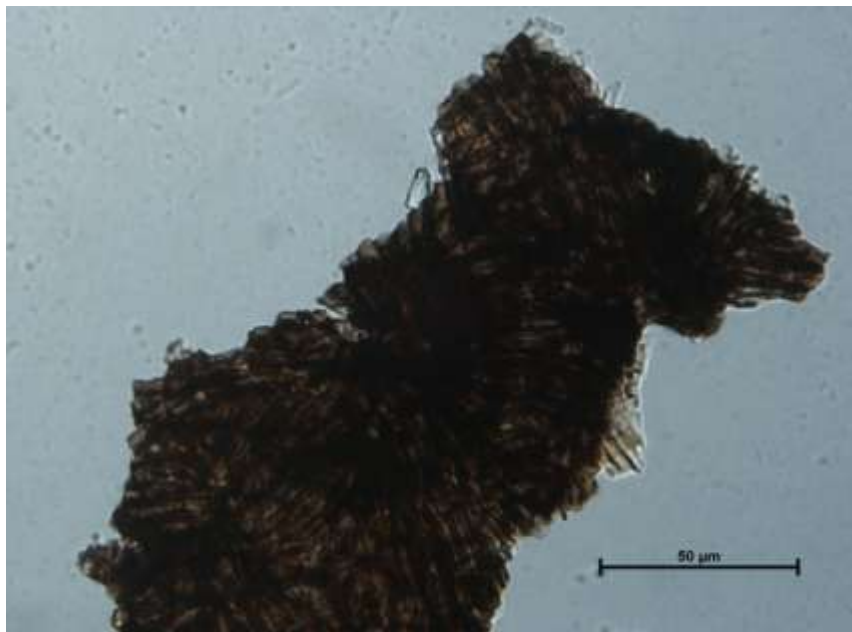
Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



Slika 6: *Cenococcum geophilum* Fr. Slika plašča, zvezdasti tip G po Agerer (1987-2008)

Molekularne metode: Pri molekularnih metodah smo na agaroznem gelu dobili dve progi (3* in 3A* v preglednici 16, slika 4). Za progo 3* smo po analizi in primerjavi sekvence z

Preglednica 19: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 14 (*SLO_IS_003_BU60_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 14 (<i>SLO_IS_003_BU60_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	491
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	EU668240.1	Uncultured <i>Cenococcum</i> isolate	1012	0,0	509/511 (99 %)	0/511 (0 %)
	GU452521.1	Uncultured <i>Cenococcum</i> clone	992	0,0	507/513 (98 %)	2/513 (0,4 %)
	DQ474383.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Cenococcum</i> <i>geophilum</i>)	992	0,0	507/513 (98 %)	2/513 (0,4 %)
Komentar: S sekvenciranjem smo potrdili identifikacijo tipa ektomikorize po anatomsko morfološki metodi. Vzorec <i>SLO_IS_003_BU60_S</i> je <i>Cenococcum geophilum</i> .						

Preglednica 20: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 13 (*SLO_IS_003_BU60_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 13 (<i>SLO_IS_003_BU60_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	581
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	EF417824.1	Uncultured <i>Sebacinales</i> clone	1144	0,0	593/605 (98 %)	4/605 (0,7 %)
	FJ196971.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Sebacinales</i>)	1138	0,0	592/605 (97 %)	4/605 (0,7 %)
	EF218817.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Sebacinaceae</i>)	1130	0,0	595/612 (97 %)	6/612 (1 %)
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov GenBank so sekvence gliv, ki se uvrščajo v red <i>Sebacinales</i> oziroma družini <i>Sebacinaceae</i> . Na podlagi tega bi lahko sklepali, da mikorizna gliva spada v družino <i>Sebacinaceae</i> . Ker je vzorec 13 eden izmed dveh prog, ki smo jih reamplificirali, je možno tudi, da se je DNK prenesla iz okolja in da v tem primeru ne gre za ECM. Vsi trije zadetki v bazi podatkov so namreč združeni v skupino okoljskih vzorcev (environmental samples).						

4.1.1.4 SLO_IS_006_BU112_S

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna do rahlo ukrivljena
Površina:	groba, svetleča, na površini so pogosti delci substrata, opazimo lahko posamezne rjave pege
Dolžina:	do 6 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,12- 0.21 mm
Obarvanost:	rjava
Obarvanost apeksa:	rjav, lahko nekoliko temneje obarvan
Izhajajoči elementi:	nismo opazili

Anatomija plašča:

Zunanji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008) s posameznimi
 kratkimi segmenti
Notranji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008)

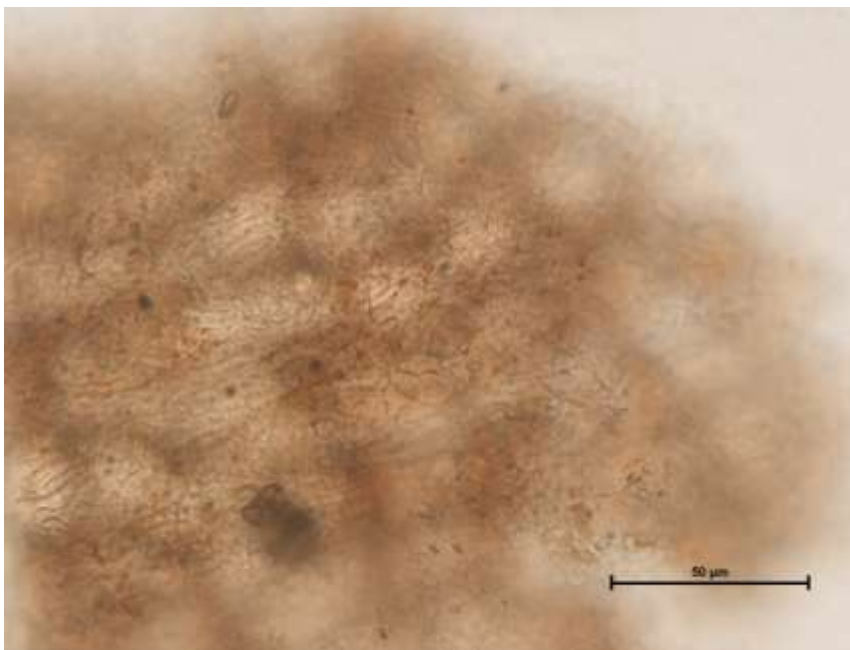
Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: nismo opazili
Rizomorfi: nismo opazili
Cistide: nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



Slika 7: *Peziza ostracoderma*. Anatomija plašča-tip E po Agerer (1987-2008) s posameznimi kratkimi segmenti.

Številka vzorca: 16 (<i>SLO_IS_006_BU112_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	615
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	GQ267495.1	Uncultured fungus	1242	0,0	635/643 (98 %)	1/643 (0,2 %)
	GU990362.1	Uncultured Peziza isolate	1228	0,0	625/631 (99 %)	1/631 (0,2 %)
	EU819461.1	<i>Peziza ostracoderma</i>	1222	0,0	631/643 (98 %)	1/643 (0,2 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Peziza</i> sp. oziroma vrsto <i>Peziza ostracoderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_006_BU112_S</i> v rodu <i>Peziza</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

Preglednica 22: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 17 (*SLO_IS_006_BU112_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 17 (<i>SLO_IS_006_BU112_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	542
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	EU917102.1	Uncultured fungus clone RFLP24	1040	0,0	538/550 (97 %)	0/550 (0 %)
	EU554928.1	Uncultured fungus clone 78a02	1018	0,0	518/524 (98 %)	0/524 (0 %)
	EU726288.1	Uncultured <i>Helotiales</i> clone PP47 D1	860	0,0	479/508 (94 %)	4/508 (0,8 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov GenBank je gliva iz redu <i>Helotiales</i> , in je v bazi GenBank uvrščen med okoljske vzorce (environmental samples). Menimo, da DNK vzorca 17 ne izvira iz ECM, temveč iz naključne glive iz substrata. DNK, ki se je med PCR pomnožila, smo najverjetneje prenesli v ekstrakcijski pufer med odvzemanjem mikoriznega vršička.						

4.1.1.5 SLO_IS_007_BU112_S

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	iregularno pinatno
Oblika:	ukriviljena
Površina:	groba, nagubana površina, na površini so delci substrata
Dolžina:	do 1 cm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,09-0,21 mm
Obarvanost:	osnovna barva je oker do rjava, delci substrata prilepljenega na površino dajejo na videz rumeno barvo
Obarvanost apeksa:	temno rjav
Izhajajoči elementi:	nismo opazili

Anatomija plašča:

Zunanji sloj: prehodni tip med tipom H in L po Agerer (1987–2008)

Notranji sloj: pseudoparenhimatski, tip L po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: nismo opazili

Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



Slika 8: *Leptodontidium orchidicola*. Slika tipa ektomikorize.

Molekularne metode: Tudi pri vzorcu 19 smo na agaroznem gelu dobili tri proge 5*, 5A* in 5B*(preglednica 16, slika 4). Za vzorec 5* smo s pomočjo baze podatkov GenBank

ugotovili, da sekvenca pripada gostiteljski rastlini *Fagus sylvatica* L.. Vzorec 5A* je gliva iz rodu *Leptodontidium* (preglednica 23). Za vzorec 5B* je bil kromatogram neberljiv.

Preglednica 23: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 19 (*SLO_IS_007_BU112_S*) (preglednica 16), z bazami podatkov.

Številka vzorca: 19 (<i>SLO_IS_007_BU112_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	569
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	GU055637.1	Uncultured <i>Leptodontidium</i> clone NG_P_E05	1056	0,0	557/571 (97 %)	4/571 (0,7 %)
	EU003001.1	Uncultured <i>ascomycete</i> clone 11f	1056	0,0	557/571 (97 %)	4/571 (0,7 %)
	AF486133.1	<i>Leptodontidium orchidicola</i>	1056	0,0	555/570 (97 %)	2/570 (0,4 %)
Komentar: Najbližji zadetek v bazi podatkov GeneBank je z relativno visoko identičnostjo (97 %) rod <i>Leptodontidium</i> , zato smo se odločili, da vzorec 19 uvrstimo v imenovani rod. Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_007_BU112_S</i> v rodu <i>Leptodontidium</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo..						

4.1.1.6 SLO_IS_011_BU30_S (*Tuber* sp.1)

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna, lahko tudi rahlo ukrivljena
Površina:	gladka
Dolžina:	do 5 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,20-0,37 mm
Obarvanost:	rjava
Obarvanost apeksa:	rjava

Izhajajoči elementi: cistide

Anatomija plašča:

Zunanji sloj: pseudoparenhimatski, tip D po Agerer (1987-2008) , hife oblikujejo mrežo iz katere izraščajo cistide

Notranji sloj: pseudoparenhimatski z epidermoidnimi celicami, tip M po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: nismo opazili

Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: Ježasto izraščajo iz mikoriznega plašča, tip A po Agerer (1987-2008)

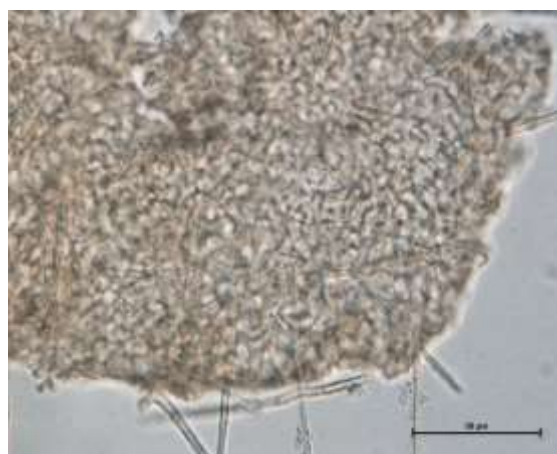
Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



a



b

Slika 9: *Tuber* sp.1. a-Tip ektomikorize. B-cistidiji, ki izraščajo iz plašča

Preglednica 24: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 6 (*SLO_IS_011_BU30_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 6 (<i>SLO_IS_011_BU30_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	646
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	AY748861.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Tuber</i>)	1332	0,0	666/666 (100 %)	0/666 (0 %)
	GQ267493.1	<i>Tuber</i> sp.	1316	0,0	662/666 (99 %)	0/666 (0 %)
	DQ068998.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Tuber</i>)	1258	0,0	633/634 (99 %)	1/634 (0,2 %)
Komentar: Vsi trije najbolj podobni zadetki so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> sp., zato smo vzorec 6 uvrstili v ta rod. Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_011_BU30_S</i> v rodu <i>Tuber</i>, smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

Preglednica 25: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 11 (*SLO_IS_011_BU30_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 11 (<i>SLO_IS_011_BU30_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	610
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	AY748861.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Tuber</i>)	1258	0,0	631/632 (99 %)	0/632 (0 %)
	GQ267493.1	<i>Tuber</i> sp.	1242	0,0	627/632 (99 %)	0/632 (0 %)
	EU379679.1	<i>Tuber</i> sp.	1236	0,0	626/630 (99 %)	1/630 (0,2 %)
Komentar: Vsi trije najbolj podobni zadetki so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> sp., zato smo vzorec 11 uvrstili v ta rod. Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_011_BU30_S</i> v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

4.1.1.7 SLO_IS_012_BU7_S (*Tuber* sp.2)

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna
Površina:	gladka
Dolžina:	do 5 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,20- 0,37 mm
Obarvanost:	rjava
Obarvanost apeksa:	rjava
Izhajajoči elementi:	cistide

Anatomija plašča:

Zunanji sloj:	pseudoparenhimatski, tip D po Agerer (1987-2008) , hife oblikujejo mrežo iz katere izraščajo cistide
---------------	--

Notranji sloj: prehodni tip med pseudoparenhimatskim in plektenhimatskim, tip H po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: nismo opazili

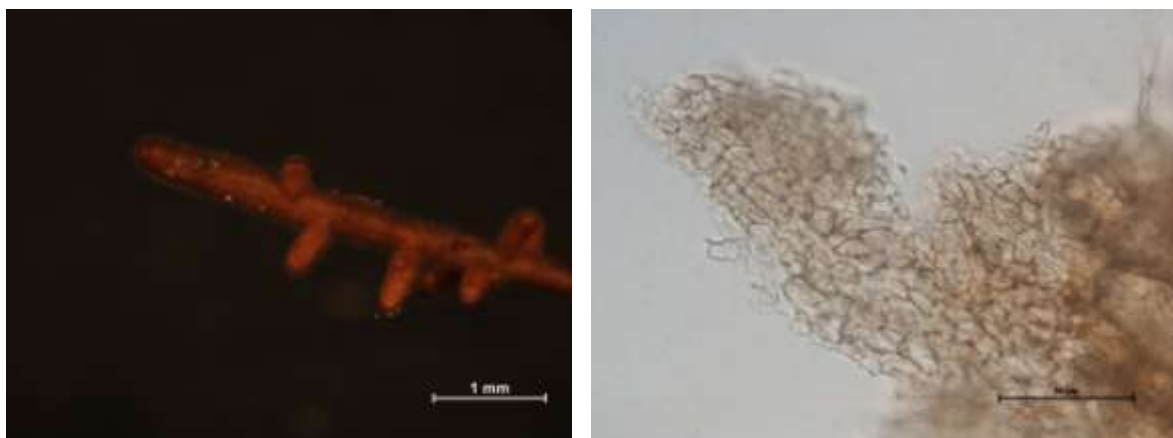
Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: Ježasto izraščajo iz mikoriznega plašča, tip A po Agerer (1987-2008)

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



a

b

Slika 10: *Tuber* sp.2. a-Tip ektomikorize. B-anatomija notranjega sloja plašča:tip H po Agerer (1987-2008)

Molekularne metode: Pri vzorcu (*SLO_IS_012_BU7_S*) smo dobili dva različno dolga pomnožka (7 in 7A) (slika 4). V sekvenciranje smo poslali vzorec 7 (preglednica 16), kjer prog nismo izrezovali in ločevali, ter vzorca 12 in 21 (preglednica 16, slika 4), kjer smo vsako progo posebej izrezali. Vzorca 12 (proga 7 na sliki 4) pred sekvenciranjem nismo ponovno pomnožili s PCR reakcijo, medtem ko smo vzorec 21 pred sekvenciranjem (proga

Preglednica 26: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 7 (*SLO_IS_012_BU7_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 7 (<i>SLO_IS_012_BU7_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	650
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	AY748861.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Tuber</i>)	1332	0,0	666/666 (100 %)	0/666 (0 %)
	GQ267493.1	<i>Tuber</i> sp.	1320	0,0	664/668 (99 %)	0/668 (0 %)
	DQ068998.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Tuber</i>)	1258	0,0	633/634 (99 %)	1/634 (0 %)
Komentar: Vsi trije najbolj podobni zadetki so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> sp., zato smo vzorec 7 uvrstili v omenjeni rod. Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_012_BU7_S</i> v rodu <i>Tuber</i>, smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

Preglednica 27: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 21 (*SLO_IS_012_BU7_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 21 (<i>SLO_IS_012_BU7_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	606
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	AY748861.1	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Tuber</i>)	1228	0,0	614/614 (100 %)	0/614 (0 %)
	GQ267493.1	<i>Tuber</i> sp.	1212	0,0	610/614 (99 %)	0/614 (0 %)
	EU379679.1	<i>Tuber</i> sp.	1208	0,0	611/614 (99 %)	1/614 (0 %)
Komentar: Vsi trije najbolj podobni zadetki so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> sp., zato smo vzorec 21 uvrstili v ta rod. Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_012_BU7_S</i> v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

4.1.1.8 SLO_IS_013_BU107_S

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna do rahlo ukrivljena
Površina:	groba, svetleča
Dolžina:	do 3 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,17- 0.26 mm
Obarvanost:	rjava ali oker s posameznimi rjavimi pegami na površini
Obarvanost apeksa:	enaka
Izhajajoči elementi:	nismo opazili

Anatomija plašča:

Zunanji sloj:	pseudoparenhimatski, tip L po Agerer (1987-2008)
---------------	--

Notranji sloj: pseudoparenhimatski, prehoden tip med tipom L in M po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: nismo opazili

Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: nismo opazili

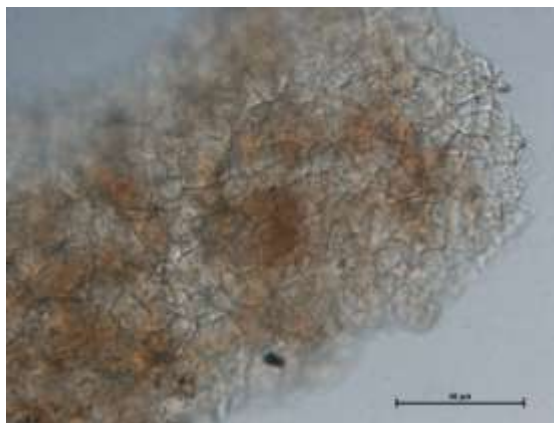
Barvne reakcije z reagenti: Sulfovanilin – nismo opazili reakcije

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



a



b

Slika 11: *Peziza ostracoderma*. a-Tip ektomikorize. b-Notranje plasti plašča pseudoparenhimatski, prehoden tip med tipom L in M po Agerer (1987-2008)

Molekularne metode: Rezultate, ki smo jih dobili s pomočjo molekularnih analiz, smo prikazali v preglednici 28.

Preglednica 28: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 8 (*SLO_IS_013_BU107_S*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 8 (<i>SLO_IS_013_BU107_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	640
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	GU990362.1	Uncultured <i>Peziza</i> isolate	1292	0,0	654/658 (99 %)	1/658 (0 %)
	GQ267495.1	Uncultured fungus	1290	0,0	656/662 (99 %)	1/662 (0 %)
	EU819461.1	<i>Peziza ostracoderma</i>	1270	0,0	652/662 (98 %)	1/662 (0 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Peziza</i> sp. oziroma vrsto <i>Peziza ostracoderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_013_BU107_S</i> v rodu <i>Peziza</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

4.1.1.9 SLO_IS_014_BU109_S

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavna
Oblika:	rahlo do izrazito ukrivljena
Površina:	gladka
Dolžina:	do 2 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,15- 0.18 mm
Obarvanost:	bela, bleščeča zaradi zraka ujetega v preplet hif, starejši deli oker do rjavi (zraka med hifami ni več)
Obarvanost apeksa:	enaka
Izhajajoči elementi:	hife, rizomorfi

Anatomija plašča:

- Zunanji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987–2008). Med hifami pogosto zrak, ki daje bleščeč izgled mikorizi.
- Notranji sloj: plektenhimatski, tip A po Agerer (1987–2008). Hife imajo značilno krožno razporeditev.

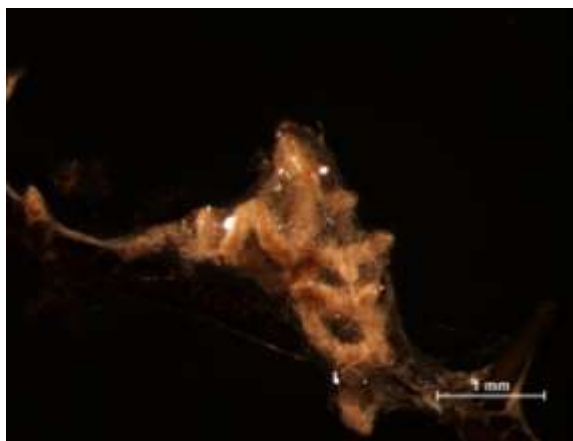
Anatomija izhajajočih elementov:

- Hife: Hife so zelo pogoste, imajo tanko steno, so neobarvane, granulirane. Hife so zelo pogoste. Preplet hif tvori plašč, vmes so ujeti zračni mehurčki. Septe so brez zaponk.
- Rizomorfi: Pogosto prisotni, diferencirani. V sredini so odebeljene ravne hife, ki jih obdajajo tanjše hife. Tip F po Agerer (1987-2008).
- Cistide: nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, pilotni poskus (S)



a



b

Slika 12: *Scleroderma areolatum*. a- Tip ektomikorize. b- rizomorf.

Molekularne metode: Rezultati molekularnih analiz so prikazani v preglednici 29.

Preglednica 29: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 9 (*SLO_IS_014_BU109_S*) (preglednica 16), z bazami podatkov.

Številka vzorca: 9 (<i>SLO_IS_014_BU109_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	740
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	EU819438.1	<i>Scleroderma areolatum</i>	1538	0,0	774/776 (99 %)	1/776 (0 %)
	DQ421114.1	Uncultured soil fungus clone	1528	0,0	772/776 (99 %)	1/776 (0 %)
	GU246989.1	Uncultured <i>Scleroderma</i> isolate	1510	0,0	769/774 (99 %)	3/774 (0 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov je sekvenca glive, ki se uvršča v vrsto <i>Scleroderma areolatum</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_014_BU109_S</i> v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

4.1.1.10 *SLO_IS_008_BU53_J*

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	enostavna
Oblika:	rahlo do izrazito ukrivljena, lahko izgleda kot nalomljena
Površina:	gladka
Dolžina:	do 3 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,20- 0.26 mm
Obarvanost:	bela, srebrna, bleščeča zaradi zraka ujetega v preplet hif, starejši deli oker do rjavi (zraka med hifami ni več)
Obarvanost apeksa:	enaka
Izhajajoči elementi:	hife, rizomorfi, posamezne cistide

Anatomija plašča:

- Zunanji sloj: plektenhimatski, tip A po Agerer (1987-2008).
Notranji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008). Opazili smo posamezne kratke segmente.

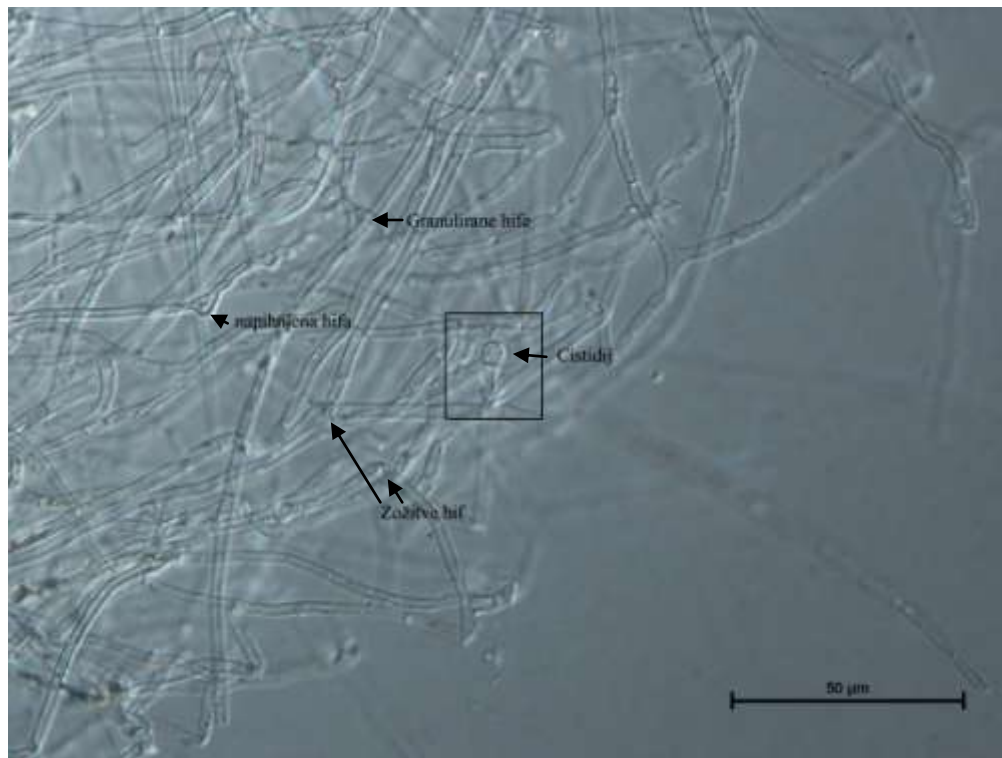
Anatomija izhajajočih elementov:

- Hife: Hife so zelo pogoste, nimajo zaponk. Povezave med hifami so tipa b₂ po Agerer (1987-2008). Opazili smo posamezne zožitve hif. Pred razvejitvami je celična stena odebeljena. Opazili smo doliporne septe. Hife so dveh tipov: granulirane in gladke.
Rizomorfi: Pogosto prisotni, diferencirani. V sredini so odebeljene ravne hife, ki jih obdajajo tanjše hife. Tip F po Agerer (1987-2008).
Cistide: posamezne cistide tipa N po Agerer (1987-2008).

Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

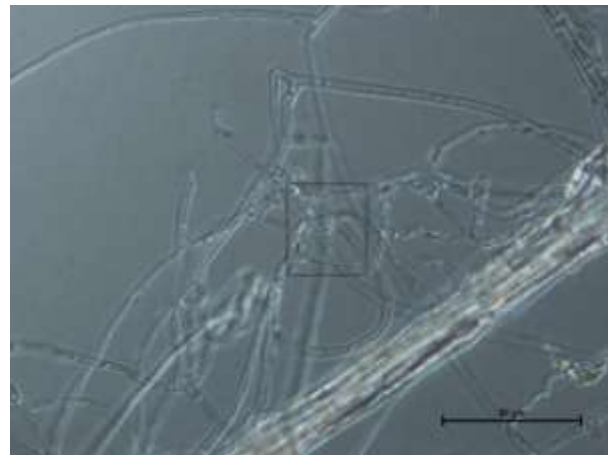
Nahajališče: drevesnica Muta, novi poskus (J)



a



b



c

Slika 13: *Scleroderma areolatum*. a- Cistide tipa N po Agerer 1987-2008, različni tipi hif: napuhnjena, granulirana in zožitve hif pred razvejanjem. b- Tip ektomikorize. c- Rizomof in hife. V kvadratu je poudarjena povezava med hifami tipa b_2 po Agerer (1987-2008).

Molekularne metode: Rezultati molekularnih analiz so prikazani v preglednici 30.

Preglednica 30: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 3 (*SLO_IS_008_BU53_S*) (preglednica 16), z bazami podatkov.

Številka vzorca: 3 (<i>SLO_IS_008_BU53_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	739
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	EU819438.1	<i>Scleroderma areolatum</i>	1508	0,0	756/757 (99 %)	0/757 (0 %)
	EU784416.1	<i>Scleroderma verrucosum</i>	1504	0,0	754/757 (99 %)	0/757 (0 %)
	DQ421114.1	Uncultured soil fungus clone	1498	0,0	754/757 (99 %)	0/757 (0 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v vrsti <i>Scleroderma areolatum</i> in <i>Scleroderma verrucosum</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_008_BU53_S</i> v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

4.1.1.11 SLO_IS_009_BU50_J

Morfologija mikoriznega sistema:

Razraščanje:	monopodialni piramidalno
Oblika:	rahlo do izrazito ukrivljena
Površina:	gladka, na površino so pogosti prilepljeni delci substrata
Dolžina:	do 5 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,14-0,27 mm
Obarvanost:	oker do nežno rumena
Obarvanost apeksa:	svetlo rjav, vendar ni nujno vedno različne barve
Izhajajoči elementi:	hife

Anatomija plašča:

Zunanji sloj:	pseudoparenhimatski z nepravilno oblikovanimi celicami
---------------	--

Notranji sloj: plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife: Hife so redko prisotne, brezbarvne, nimajo zaponk. Na površini hif smo opazili kristalčke.

Rizomorfi: nismo opazili

Cistide: nismo opazili

Barvne reakcije z reagenti: Sulfovanilin-nismo opazili reakcije

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, novi poskus (J)



Slika 14: Slika tpa ECM vzorca SLO_IS_009_BU50_J.

Molekularne metode: V sklopu molekularnih metod nismo prišli do natančnejših rezultatov, ker je bil kromatogram neberljiv, najverjetneje kot posledica mešanice pomnožkov ITS1-5,8S rDNK-ITS2 dveh različnih glivnih taksonov, prisotnih v vzorcu SLO_IS_009_BU50_J.

4.1.1.12 SLO_IS_010_BU45_J

Razraščanje:	enostavna
Oblika:	ravna do rahlo ukrivljena
Površina:	gladka, svetlikajoča, na površino so lahko redko prilepljeni posamezni delci substrata
Dolžina:	do 3 mm
Premeri osi:	premer glavne in stranskih osi 0,18-0,23 mm
Obarvanost:	siva, na območjih, kjer je na površino prilepljen substrat je lahko površina rumeno do oker obarvana
Obarvanost apeksa:	enaka
Izhajajoči elementi:	hife

Anatomija plašča:

Zunanji sloj:	plektenhimatski s posameznimi kratkimi odseki, tip E po Agerer (1987-2008).
Notranji sloj:	plektenhimatski, tip E po Agerer (1987-2008).

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	Redke, tanke, brezbarvne, septirane. Septe lahko imajo zaponke.
Rizomorfi:	Nismo opazili
Cistide:	Nismo opazili

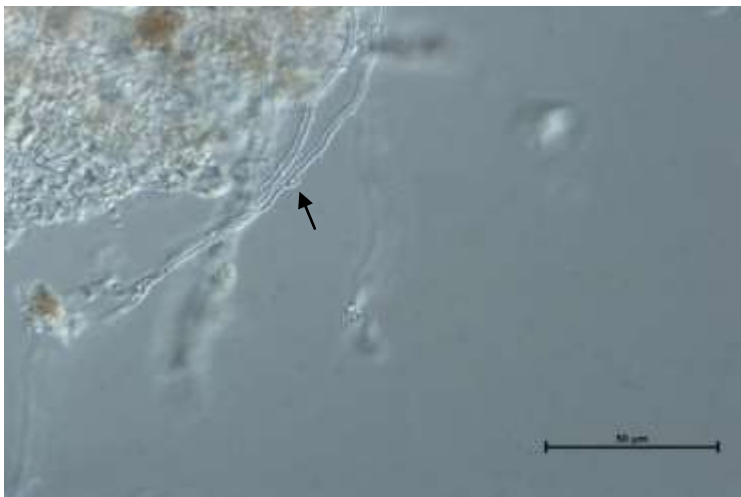
Barvne reakcije z reagenti: nismo opravili

Partner: *Fagus sylvatica* L.

Nahajališče: drevesnica Muta, novi poskus (J-jesen)



a



b

Slika 15: *Laccaria proxima*. a- Tip ektomikorize. b- Hife. Na sliki je s puščico označena septa z zaponkami.

Molekularne metode: Rezultati analiz so prikazani v preglednici 31.

Preglednica 31: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorca 5 (*SLO_IS_010_BU45_J*) (preglednica 16) z bazami podatkov.

Številka vzorca: 5 (<i>SLO_IS_010_BU45_J</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	688
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	AJ534899.1	<i>Laccaria</i> sp.	1358	0,0	679/679 (100 %)	0/679 (0 %)
	GU990354.1	Uncultured <i>Laccaria</i> isolate	1318	0,0	688/706 (97 %)	1/706 (0 %)
	GQ267477.1	<i>Laccaria proxima</i>	1318	0,0	689/707 (97 %)	2/707 (0 %)
Komentar: Najbližji zadetek iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Laccaria</i> sp. Vzorec 5 smo zato uvrstili v ta rod. Tretji najbližji zadetek za vzorec 5 je <i>Laccaria proxima</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNK regijo smo pomnožili v vzorcu <i>SLO_IS_010_BU45_J</i> v rodu <i>Laccaria</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.						

4.1.2 Združitev tipov ektomikorize

Tipi ektomikorize, kot so *Peziza ostracoderma*, *Tuber* sp. in *Scleroderma areolatum* so se med analizami večkrat pojavili pri različnih sadikah bukve. Sklepali smo, da bi lahko šlo za iste organizme, ki smo jih po anatomsko-morfološki metodi določili kot različne. V ta namen smo naredili primerjavo sekvenc s programom MEGA 4.1. Ugotovili smo, da so sekvence, ki se pojavijo večkrat, identične. Torej gre za enake tipe ektomikorize in ne za dva ločena tipa, kot smo sprva sklepali na podlagi anatomsko-morfološke metode določanja tipov ektomikorize. Na podlagi tega smo vzorce 6, 7, 11 in 21 (preglednica 16) združili v skupino *Tuber* sp., vzorca 8 in 16 v skupino gliv, ki so po podobnosti nukleotidnega zaporedja najbližje vrsti *Peziza ostracoderma* (GenBank EU819461.1) (preglednica 16) in vzorca 3 in 9 (preglednica 16) v skupino gliv, ki so po podobnosti nukleotidnega zaporedja najbližje vrsti *Scleroderma areolatum* (GenBank EU819438.1).

Poleg glivne DNK, smo pri štirih vzorcih (*SLO_IS_006_BU112_S*, *SLO_IS_007_BU112_S*, *SLO_IS_011_BU30_S* in *SLO_IS_012_BU7_S*) pomnožili tudi DNK gostiteljske rastline *Fagus sylvatica* L. Sekvence omenjenih vzorcev, ki so po podobnosti nukleotidnega zaporedja najbližje gostiteljskemu organizmu *Fagus sylvatica* L. (GenBank AY748861.1) smo po primerjavi sekvenc s programom MEGA 4.1 združili v eno skupino in prikazali v preglednici 32.

Preglednica 32: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vzorcev 10, 12, 18 in 15 (*SLO_IS_006_BU112_S*, *SLO_IS_007_BU112_S*, *SLO_IS_011_BU30_S* in *SLO_IS_012_BU7_S*) (preglednica 16), z bazami podatkov.

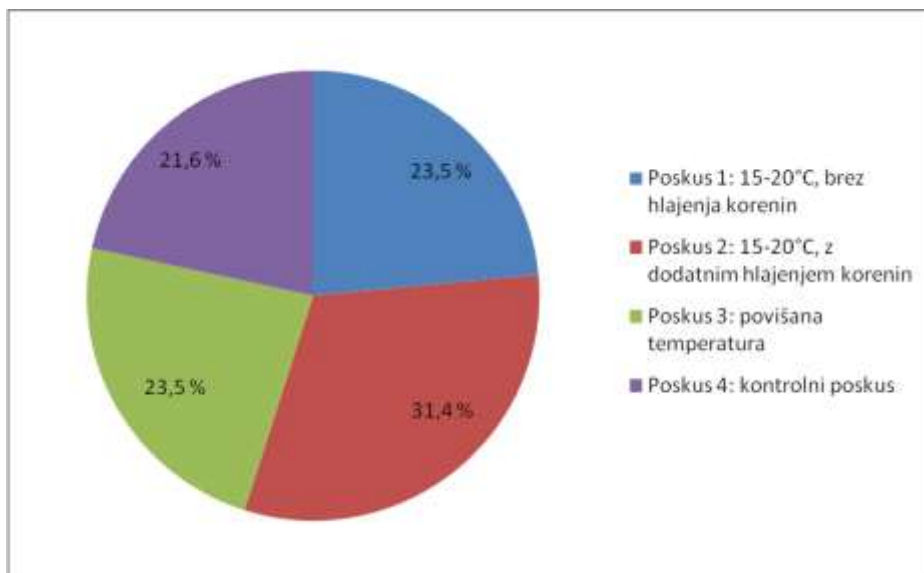
Številka vzorca: 10 (<i>SLO_IS_011_BU30_S</i>)					Dolžina zaporedja (bp)	697
	Šifra zaporedja	Opis vzorca (GeneBank)	Rezultat	Verjetnost	Identičnost	Vrzeli
Najbližji zadetki	AJ888473.1	<i>Fagus sylvatica</i>	1408	0,0	712/718 (99 %)	0/718 (0 %)
	AY232982.1	<i>Fagus sylvatica</i> subsp. <i>sylvatica</i>	1400	0,0	702/703 (99 %)	0/703 (0 %)
	AY232975.1	<i>Fagus sylvatica</i> subsp. <i>sylvatica</i>	1400	0,0	702/703 (99 %)	0/703 (0 %)
Komentar: Najbližji zadetki v bazi podatkov GeneBank ustrezajo gostiteljski rastlini <i>Fagus sylvatica</i> subsp. <i>sylvatica</i> .						

4.1.3 Primerjava pojavljanja tipov ECM v pilotnem poskusu pri različnih pogojih

Analize pojavljanja tipov ektomikorize smo naredili za pilotni poskus, ki je bil zastavljen spomladi 2009. Za novi poskus, ki smo ga zastavili v jeseni 2009, nismo delali analiz, ker nismo pregledali koreninskih sistemov vseh sadik bukev in zato rezultati ne bi bili relevantni. Mikorizno glivo *Laccaria proxima* smo izpustili iz analize primerjav tipov ektomikorize, saj smo jo identificirali na sadiki bukve iz novega poskusa.

4.1.3.1 Pojavljanje tipov ektomikorize v pilotnem poskusu

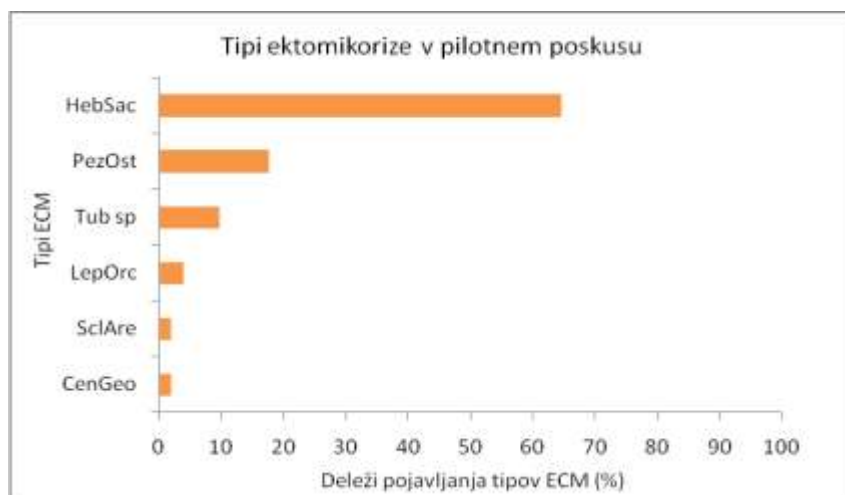
V celotnem pilotnem poskusu smo identificirali tipe ECM na 51 koreninskih vršičkih pri 40 sadikah bukve od skupaj 72 sadik. Na 32 sadikah bukve nismo identificirali nobenega tipa ECM. Od 51 koreninskih vršičkov z mikorizo, smo identificirali po 12 (23,5 %) mikoriznih vršičkov v poskusu 1 in 3, 16 (31,4 %) v poskusu 2 ter 11 (21,6 %) mikoriznih vršičkov v poskusu 4. V poskusu 1 je bilo 6 tipov ECM na 6-ih sadikah od 7-ih odmrlih sadik. 6 tipov ECM je bilo na 4-ih sadikah od 11-ih vitalnih sadik. V poskusu 2 je bilo 15 tipov ECM na 11-ih sadikah od 15-ih odmrlih sadik in 1 tip ECM na eni sadiki od treh vitalnih sadik. V poskusu 3 so vse sadike odmrle. Identificirali smo 12 tipov ECM na 11-ih sadikah. V poskusu 4 smo identificirali 11 tipov ECM na 7-ih sadikah od 8-ih odmrlih sadik in nobenega tipa ECM na vitalnih sadikah. Največji delež ektomikorize smo določili pri poskusu 2, kjer so bile sadike bukev v komori pri temperaturi od 15-20° C, z dodatnim ohlajanjem koreninskega sistema. Najmanjši delež ektomikorize smo našli v poskusu 4. Pri poskusih 1 in 3, je delež pojavljanja ektomikoriznih gliv enak (slika 16).



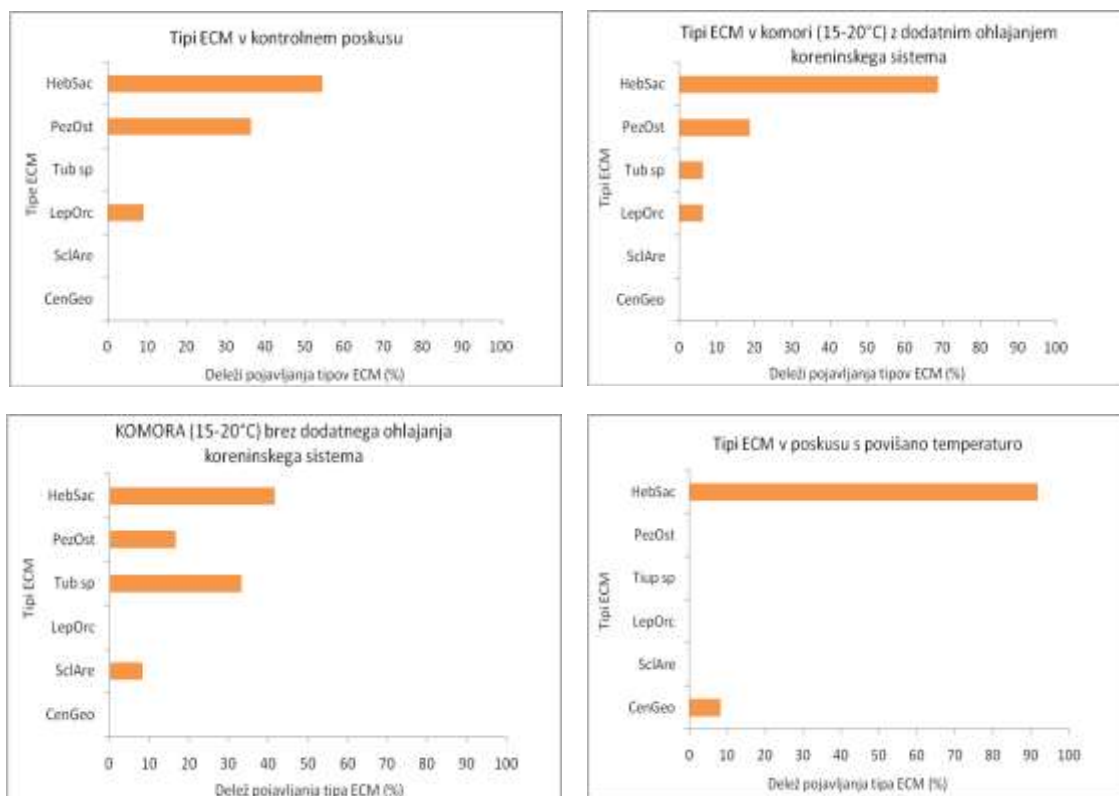
Slika 16: Delež ektomikoriznih kratkih korenin glede na pregledane koreninske vršičke sadik bukve v pilotnem poskusu pri štirih različnih pogojih (povišana temperatura, 15-20° C brez dodatnega ohlajanja koreninskega sistema, 15-20° C z dodatnim ohlajanjem koreninskega sistema in kontrolni poskus, kjer so bile sadike izpostavljene zunanji temperaturi).

4.1.3.2 Delež pojavljanja tipov ektomikorize v posameznem poskusu glede na celotni pilotni poskus

Deleže pojavljanja posameznih tipov ektomikorize smo prikazali na slikah 17 in 18. Največkrat smo na sadikah bukve identificirali *Hebeloma sacchariolens* (64,7 %), sledile so *Peziza ostracoderma* (17,6 %), *Tuber* sp. (9,8 %), *Leptodontidium orchidicola* (30,9 %), *Scleroderma areolatum* in *Cenococcum geophilum* z 2 % (slika 17). V vsakem od obeh poskusov, kjer so bile sadike bukev izpostavljene temperaturi 15-20° C, smo določili štiri tipe ektomikorize. Na sadikah bukev, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi (do 50° C), smo identificirali dva tipa ektomikorize in na sadikah kontrolnega poskusa 3 ECM tipe (slika 18).



Slika 17: Deleži pojavljanja tipov ektomikorize na sadikah bukve v pilotnem poskusu. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*.

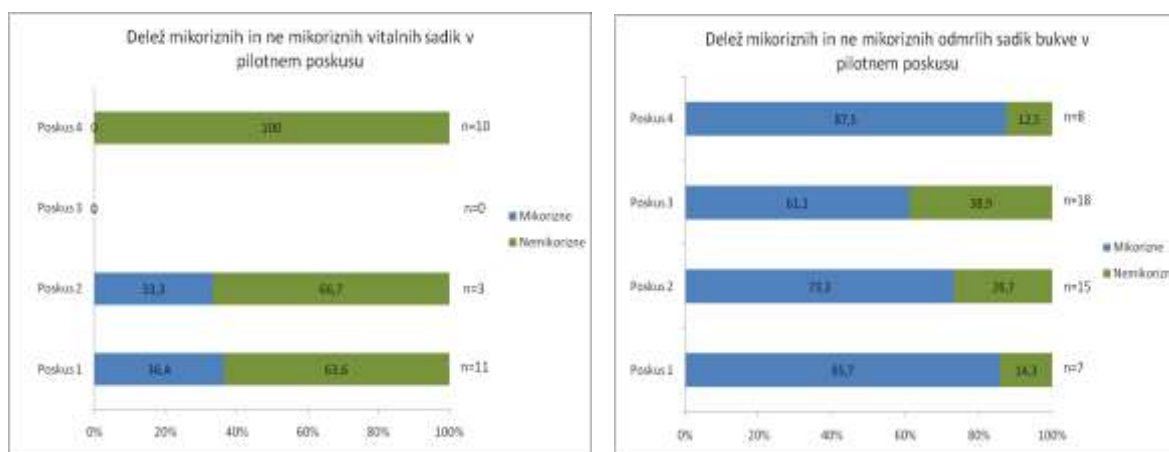


Slika 18: Deleži pojavljanja ektomikorize na sadikah bukve v kontrolnem poskusu in pri treh različnih temperaturni pogojih rasti. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*.

4.1.3.3 Primerjava pojavljanja ektomikoriznih tipov na vitalnih in odmrlih sadikah bukve iz pilotnega poskusa

Pri sadikah pilotnega poskusa smo naredili primerjavo za delež mikoriznih in nemikoriznih koreninskih vršičkov na vitalnih in odmrlih sadikah, za vsak poskus posebej. Na koreninskih vršičkih vitalnih sadik, smo ECM identificirali v poskusu 1 in 2. V poskusu 1 je za 2 % več ECM vršičkov, kot v poskusu 2, vendar moramo upoštevati, da je v poskusu 1 tudi več vitalnih sadik, kot v poskusu 2. Če bi bilo v poskusu 2 več vitalnih sadik, bi morda identificirali večji delež ECM na koreninskih vršičkih. V poskusu 3 so vse sadike odmrle, zato tipov ECM na vitalnih sadikah ni bilo mogoče identificirati. V poskusu 4 je bilo 10 vitalnih sadik, vendar na nobeni od njih nismo identificirali tipov ECM. Odstotke

mikoriznih in nemikoriznih koreninskih vršičkov na vitalnih sadikah bukve smo prikazali na sliki 19. Pojavljanje mikoriznih in nemikoriznih tipov ECM v pilotnem poskusu smo na grafu predstavili tudi za odmrle sadike (slika 19). Na grafu opazimo, da je pri odmrlih sadikah v primerjavi z vitalnimi sadikami, več ektomikorize, kar je posledica tega, da smo pri odmrlih sadikah s pomočjo stereo lupe pregledali celotne koreninske sisteme, medtem ko smo pri vitalnih sadikah koreninske sisteme pregledovali s prostim očesom.



Slika 19: Primerjava pojavljanja tipov ektomikorize pri vitalnih in odmrlih sadikah bukve v pilotnem poskusu. n-število vitalnih/odmrlih sadik v pilotnem poskusu.

4.1.4 Pestrost ektomikorize

Največkrat smo identificirali *H. sacchariolens* (priloga D). V kontrolnem poskusu smo jo opazili pri šestih sadikah. Poleg nje smo opazili še *Tuber* sp. pri eni sadiki in *P. ostracoderma* pri štirih sadikah. Vse tipe smo identificirali na odmrlih sadikah bukve (priloga D4). Pri odvzemanju vzorcev za ekstrakcijo smo prenesli tudi delce substrata, zato smo pomnožili tudi DNK gliv, ki se navadno nahajajo v vzorcih iz okolja (environmental samples), specifično iz vzorcev prsti. Tako smo predstavnike redu *Hypocreales* identificirali pri dveh sadikah in predstavnike redu *Helotiales* pri štirih sadikah bukve (priloga D4). Na koreninskih sistemih sadik, izpostavljenih temperaturi 15-20° C z dodatnim ohlajanjem korenin, smo *H. sacchariolens* opazili pri 11 sadikah, *Tuber* sp. pri dveh, in pri treh sadikah *P. ostracoderma*. Tudi na koreninskih sistemih sadik tega poskusa, smo izolirali DNK predstavnikov iz okolja, ki pripadajo redu *Helotiales*

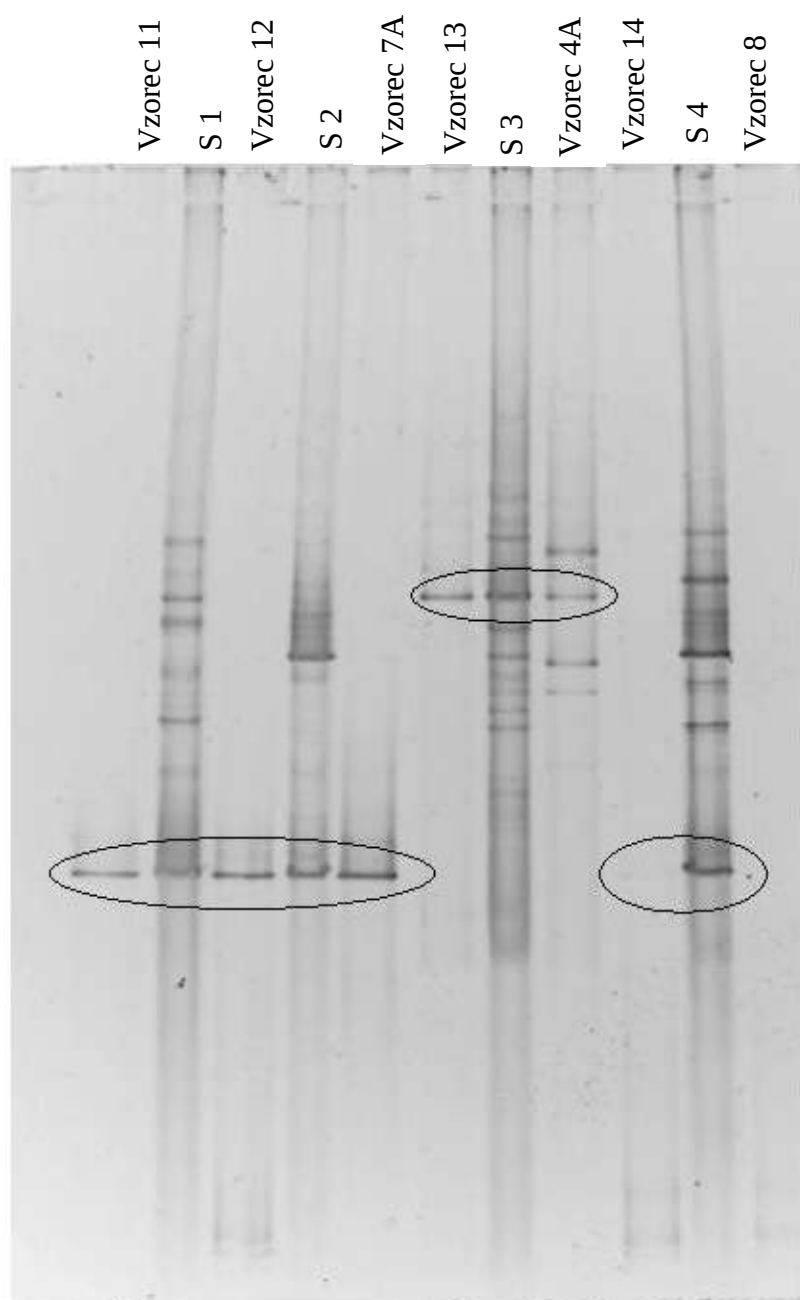
(priloga D2). Na koreninskih sistemih sadik, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C in kjer predela korenin nismo dodatno ohlajali, smo pri petih sadikah opazili *H. sacchariolens*, pri eni sadiki *S. areolatum*, *Tuber* sp. smo opazili na koreninskih sistemih štirih sadik in *P. ostracoderma* na dveh sadikah (priloga D1). Na koreninskih sistemih sadik, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi, smo enajstkrat opazili *H. sacchariolens* in enkrat *C. geophilum*. Iz substrata smo pri eni sadiki izolirali DNK glive iz redu *Sebacinales* (priloga D3).

4.2 DOKAZOVANJE ECM V VZORCU ZEMLJE Z METODO DGGE

Rezultati DGGE elektroforetske ločitve PCR pomnožkov so pokazali, da se ektomikorizne glive nahajajo tudi v substratu in ne le na koreninskem sistemu sadik (slika 20). Proge, ki pripadajo posamezni vrsti gliv, smo na sliki obkrožili. Proga vzorca 14 je slabo opazna, ker smo na gel nanесли premajhno količino DNK. Enako velja za vzorec 8, kjer proge sploh ni opaziti.

Preglednica 33: Tipi ektomikorize in oznaka substratov, ki smo jih uporabili v analizi DGGE.

Tip ektomikorize	Številka in oznaka vzorca (preglednica 12)	Oznaka substrata	Oznaka sadike (<i>Fagus sylvatica</i> L.)
<i>Tuber</i> sp.	Vzorec 11 (SLO_IS_011_BU30_S)	S1	BU30
	Vzorec 12 (SLO_IS_012_BU7_S)	S2	BU7
	Vzorec 7A (SLO_IS_012_BU7_S)		BU7
<i>Peziza ostracoderma</i>	Vzorec 8 (SLO_IS_013_BU107_S)	S3	BU107
	Vzorec 16 (SLO_IS_006_BU112_S)		BU112
<i>Scleroderma areolatum</i>	Vzorec 9 (SLO_IS_014_BU109_S)	S4	BU109
	Vzorec 3 (SLO_IS_008_BU53_J)		BU53

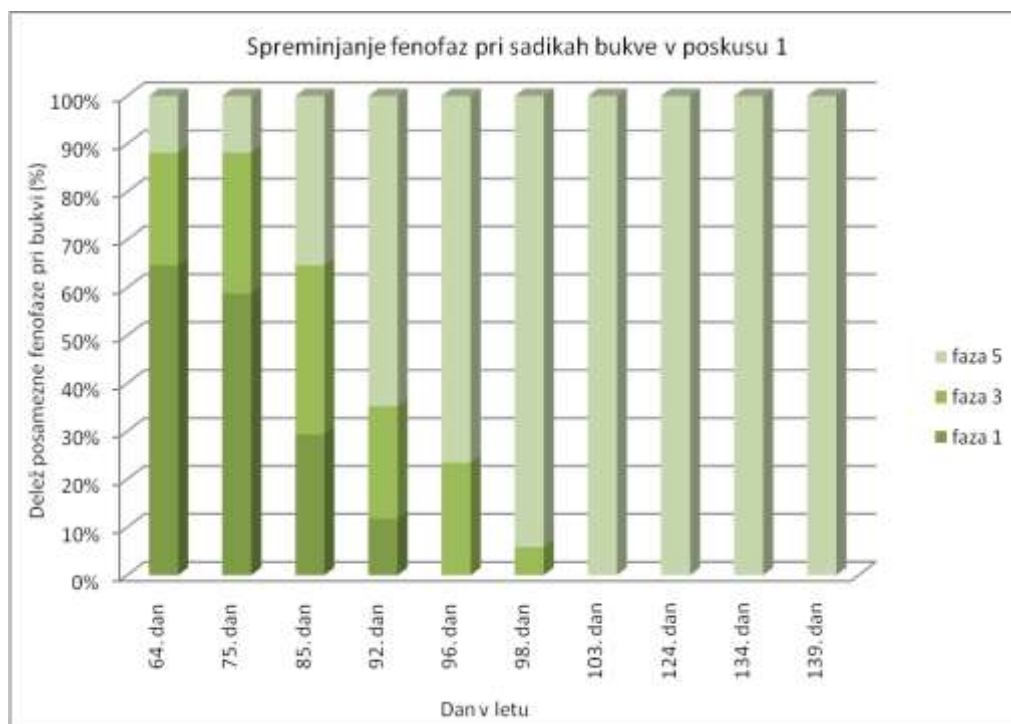


Slika 20: DGGE elektroforetska ločitev pomnožkov PCR iz izbranih vzorcev.

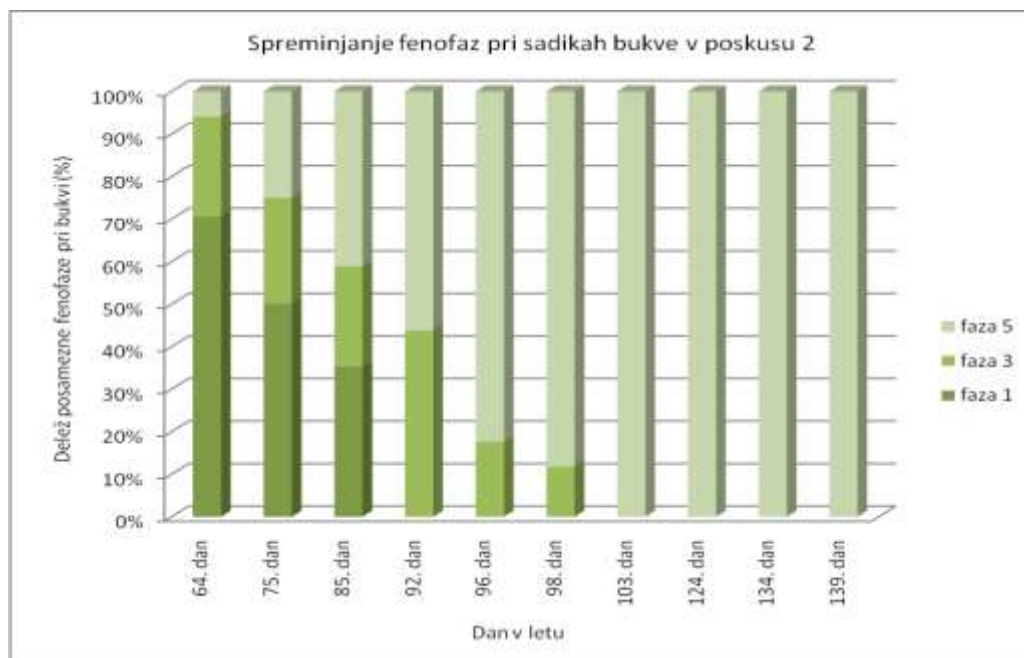
4.3 FENOFAZE NA BUKVI

4.3.1 Deleži fenofaz na sadikah bukve pri različnih pogojih

Najhitreje so olistale sadike poskusa 1, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C, brez hlajenja korenin (slika 21). Opazimo lahko, da se delež faze ena zmanjšuje, hkrati se delež faze pet povečuje. Na začetku popisovanja fenofaz, 64. julijanskega dne, so bile prisotne vse tri faze. V 92. julijanskem dnevu popisovanja so bile sadike še vedno v vseh treh razvojnih fazah, medtem ko so bile 96. dne sadike samo še v fazah 1 in 3. 103. dne v letu so bile vse sadike iz poskusa 1 v peti fazi razvoja listov. Kot druge so najhitreje olistale sadike iz poskusa 2, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C, z dodatnim hlajenjem korenin (slika 22). Tudi tukaj velja trend zmanjševanja deleža sadik v fazi ena in povečevanja deleža sadik v fazi pet. V 64. julijanskem dnevu je bil največji delež sadik v fazi ena, vendar so bile nekatere sadike že v peti fazi razvoja. V 92. julijanskem dnevu ni bilo nobene sadike več v fazi ena. V 103. julijanskem dnevu so bile vse sadike v poskusu v fazi pet. Pri sadikah, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi (slika 23), je razvoj potekal počasneje. Fenofaza pet se je pojavila v 85. julijanskem dnevu. Delež faze 5 se je do 124. dne povečeval, vse dokler niso vse sadike prešle v fazo 5. V 124. julijanskem dnevu so bile vse sadike v fazi pet. Najkasneje so olistale sadike iz kontrolnega poskusa (poskus 4) (slika 24). Sadike so bile do 103. julijanskega dne v fazi dormance oziroma v fazi ena. V 124. julijanskem dnevu se pojavi faza tri in v 134. faza pet. Do 139. julijanskega dne, ko smo popis fenofaz zaključili, je bilo v fazi pet manj kot 50 odstotkov sadik bukev kontrolnega poskusa.



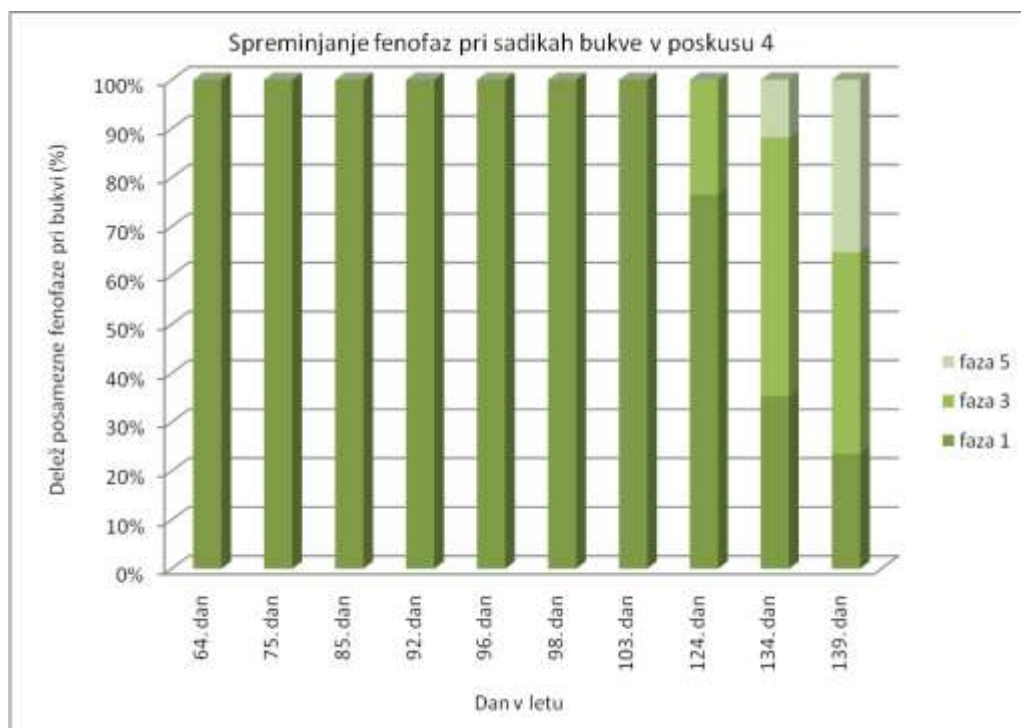
Slika 21: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve iz poskusa 1 (15-20°C brez hlajenja korenin).



Slika 22: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve iz poskusa 2 (15-20° C s hlajenjem korenin).



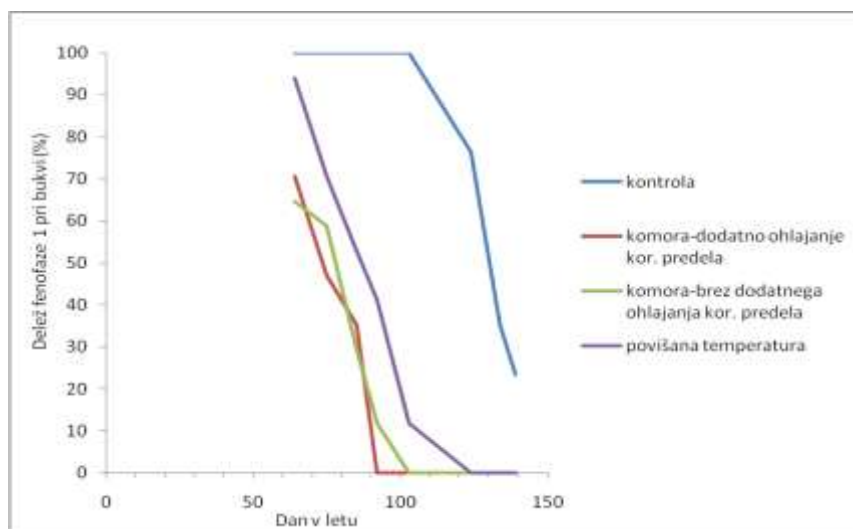
Slika 23: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve v poskusu 3 (povišana temperatura-rastlinjak).



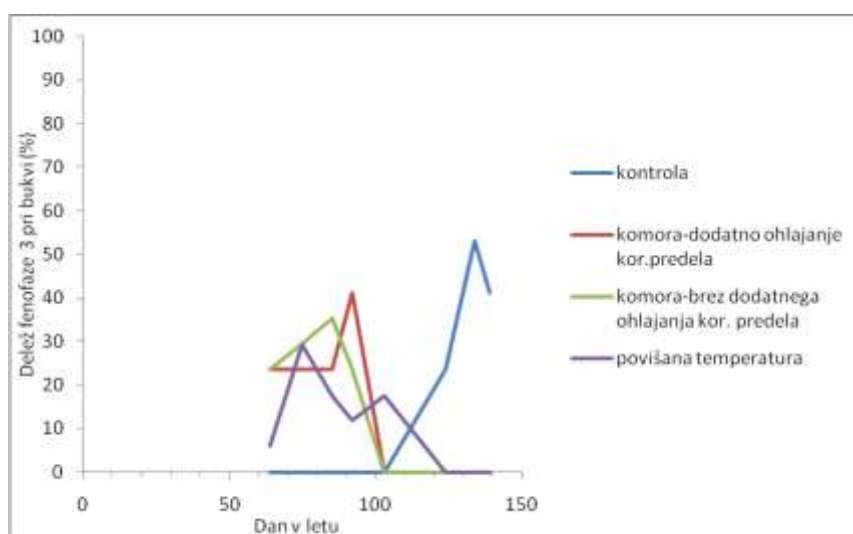
Slika 24: Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve v poskusu 4 (kontrola).

4.3.2 Spreminjanje fenofaz na sadikah bukve

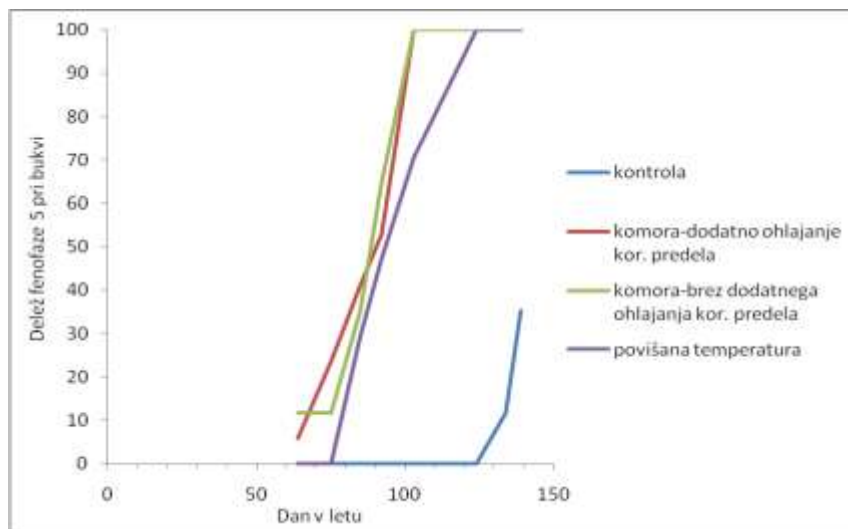
Na slikah 24-26 je prikazano spreminjanje posameznih fenofaz pri vseh štirih poskusih skupaj. Sadike bukev so postopoma prehajale iz faze 1 v fazo 5. Na začetku popisovanja, 64. julijanskega dne, je bil večji delež bukev v fazi 1 (slika 25), proti koncu popisovanja pa v fazi 5 (slika 27). Na sliki 25 vidimo, da je velik delež bukev v vseh štirih poskusih na začetku v 64. julijanskem dnevu v fazi 1. Delež bukev v fazi 1 se s pomikanjem proti 139. julijanskemu dnevu zmanjšuje. Na sliki 27 opazimo obratno situacijo. V 64. julijanskem dnevu je delež bukev v peti fazi nizek ali je enak nič in se s pomikanjem proti 139. julijanskemu dnevu povečuje vse do 100 odstotkov. Na obeh slikah izstopa krivulja kontrolnega poskusa, saj krivulja ne pade na 0 % (slika 25) oziroma ne doseže 100 % (slika 27). Razlog je v tem, da je bilo ob zaključku popisa na 139. julijanski dan, 23,5 % sadik še vedno v fazi ena (slika 25). Iz enakega razloga krivulja na sliki 27 ni dosegla 100 %. Slika 26 prikazuje spreminjanje fenofaze tri v vseh štirih poskusih. Krivulja, ki opisuje potek za fenofazo sprva narašča, ker se listi postopoma razvijajo in tako prehajajo iz faze ena v fazo tri. Potem krivulja začne upadati, ker listi iz faze tri prehajajo v fazo pet. Za sadike bukev pri povišani temperaturi pa krivulja po prvotnem upadu zopet naraste. Razlog za takšno spreminjanje krivulje je v tem, da so nekatere sadike iz faze ena prešle v fazo tri in nato v fazo pet. Pri delu sadik pa je razvoj potekal počasneje. Zato so bile te še v fazi ena, ko so bile druge že v fazi pet. Zato delež sadik v fazi tri upade in se zopet poveča, ko so preostale sadike iz faze ena prešle v fazo tri.



Slika 25: Spreminjanje fenofaze 1 na sadikah bukve v novem poskusu.



Slika 26: Spreminjanje fenofaze 3 na sadikah bukve v novem poskusu.



Slika 27: Spreminjanje fenofaze 5 na sadikah bukve v novem poskusu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Biogeokemijski procesi v gozdnih ekosistemih, ki vplivajo na tokove CO₂ med tlemi in atmosfero, so odvisni od klimatskih razmer v določenem časovnem obdobju. Poznani so učinki sezonskih sprememb na neto primarno proizvodnjo (NPP) v terestričnih ekosistemih, ne pa tudi učinki posameznih dejavnikov (npr. povišane temperature) in motenj v posameznem letu na dinamiko ogljika v naslednjih letih. Skupina raziskovalcev (Arnone in sod., 2008) je ugotovila, da segrevanje zmanjša neto izmenjavo ogljika travniškega ekosistema v letu, v katerem je bila temperatura v okolju povišana za 4° C, učinek pa se prenaša tudi v naslednja leta, v katerih je bila izmerjena znižana NPP na račun heterotrofne respiracije talnih organizmov. Vzroki povišanja temperature v nekem ekosistemu so lahko globalne narave, kot jih predvidevajo prevladujoči scenariji klimatskih sprememb, in antropogene narave, ko zaradi človeških dejavnosti prihaja do sprememb rabe tal, kompaktiranja, razgalitve gozdnih površin, ki absorbirajo več toplote kot tla pod vegetacijskim pokrovom. Povišana temperatura zaradi klimatskih sprememb v zraku vodi v zmanjšanje vlage v tleh, le-to pa v zmanjšano transpiracijo rastline. Listne reže na rastlini se zaprejo in fotosinteza se zmanjša. Zmanjšanje fotosinteze vpliva na rast in razvoj rastlin. Podobno se temperatura tal poveča na razgaljenih tleh zaradi uporabe težke mehanizacije. Uporaba težke mehanizacije na gozdnih tleh povzroči zbitost tal, pore se zamašijo in v tleh je zmanjšana količina vode in zraka, s tem pa oskrba korenin s kisikom (Böken in Lebert, 2008). Poglavitni dejavnik NPP v gozdnih tleh so organizmi v mikorizosferi, predvsem korenine in mikoriza kot ključna komponenta gozdnih talnih ekosistemov. Zato smo v diplomskem delu želeli ugotoviti vrste oziroma višje taksonomske skupine gliv, ki tvorijo ektomikorizo na izbranih sadikah bukve v rizotronih pri različnih temperaturnih pogojih.

5.1.1 Tipi ektomikorize na bukvi

Tipe ektomikorize na sadikah bukve v pilotnem poskusu smo določali na tri načine, z anatomsko-morfološko metodo po Agerer (1987-2008), z analiziranjem sekvenc in z izdelavo filogenetskih dreves. Po anatomsko-morfološki metodi smo določili dvanajst tipov ektomikorize, z analizo sekvenc (molekularne metode) smo jih določili sedem, šest do vrste in eno do rodu. Če primerjamo med seboj tipe, ki smo jih določili z omenjenima metodama, smo do vrste pravilno in identično določili le en tip ECM, *Cenococcum geophilum*. Z anatomsko-morfološko metodo redko določimo tipe ektomikorize do vrste (Kraigher in sod., 1995; Kraigher, 1996; Püttsepp, 2004). Zato danes vzporedno z anatomsko-morfološko metodo po Agerer (1991), pogosto uporabljamo še molekularne metode, oziroma pomnoževanje DNK s polimerazno verižno reakcijo (PCR), ki ji sledi sekvenciranje in analiza sekvenc. PCR tehnika ne omogoča le združevanje organizmov v posamezne skupine (grupiranje), temveč lahko rezultira v identifikaciji organizmov do vrste (Kraigher in sod., 1995). V sklopu diplomskega dela smo s pomočjo PCR metode in sekvenciranja do vrste določili 6 tipov ektomikorize (*Hebeloma sacchariolens*, *Laccaria proxima*, *Peziza ostracoderma*, *Cenococcum geophilum*, *Scleroderma areolatum* in *Leptodontidium orchidicola*), 3 vzorce do redu (*Hypocreales*, *Sebacinales* in *Helotiales*) in en tip do rodu (*Tuber* sp.).

Z namenom določitve kar največjega števila tipov ektomikorize do vrste ali vsaj do rodu, smo v našem delu neznane in dvomljivo določene tipe ektomikorize poskusili določiti z analizo ITS regij v jedrni ribosomalni DNK. Pri pomnoževanju s PCR reakcijo smo pri petih vzorcih na gelu dobili več prog (slika 4). Ker posamezna proga pomeni nov organizem, smo proge izrezali iz gela, očistili in ponovno pomnožili s PCR reakcijo. Skupaj smo v sekvenciranje poslali 21 vzorcev DNK (preglednica 16). Od 21 kromatogramov je bilo čitljivih 19. Kromatograme smo pregledali in ustrezno uredili sekvence. V vsaki sekvenci smo poiskali sekvence začetnih oligonukleotidov (ITS1-f/ITS4, ITS1/ITS4). Tako pridobljenim sekvencam smo poiskali najpodobnejše sekvence v spletni bazi podatkov GenBank. Za iskanje smo uporabili orodje BlastN (spletna stran programov BLAST, 2010). BlastN deluje po načelu iskanja lokalnih podobnosti in pri

izračunu podobnosti upošteva le primerjane odseke sekvenc. Večjih vrzeli, ki so posledica delecij ali insercij nukleotidov, in odsekov večjega neujemanja ne upošteva.

Poleg omenjenih metod smo za identifikacijo ektomikoriznih tipov na sadikah bukve izdelali filogenetska drevesa (molekularna filogenetika). Filogenetsko drevo lahko opišemo podobno kot pravo drevo. Korenina drevesa predstavlja zadnjega skupnega prednika vseh obravnavanih vrst. Na takem "golem" sistemu ali ogrodju lahko gradimo tako rekoč vso ostalo biologijo, začevši z bolj klasično sistematiko in taksonomijo. Naloge slednje so klasifikacija, ki vključuje identifikacijo taksonomskih skupin in ugotavljanje njihovih diagnostičnih značilnosti, poimenovanje, rangiranje in druge (Filogenetske osnove ... , 2010). Z omenjeno metodo, smo želeli potrditi identificirane tipe ECM, ki smo jih do vrste določili z molekularnimi metodami. Poleg tega smo poskušali določiti vrsto ECM iz rodu *Tuber* sp., kar nam z anatomsko-morfološko metodo in z molekularnimi metodami ni uspelo. Za *L. proxima*, *P. ostracoderma*, *S. areolatum* in *L. orchidicola* smo izdelali filogenetska drevesa (Priloga 3), da bi vsako od naštetih vrst dodatno potrdili.

C. geophilum je geografsko zelo razširjena vrsta z zelo širokim spektrom avtotrofnih partnerjev. Na območjih, kjer se pojavi, pogosto postane dominantna gliva (Smith in Read D. J., 2008). LoBuglio in sod. (2002) so naredili filogenetsko analizo, na osnovi primerjave 18S ribosomalne RNA podenote, med nespolno obliko *C. geophilum* in spolnimi oblikami askomicet (*Ascomycetes*). Rezultati analize so pokazali, da je *C. geophilum* osnovna, intermediarna povezava med redovima *Pleosporales* in *Dothidiales*, ki ju uvrščamo med *Loculoascomycetes*. Ker se *C. geophilum* v naravi pojavlja kot anamorf in zato ne poznamo spolnega stadija, ki je potreben za pravilno klasifikacijo gliv, ga Agerer (1987-2008) uvršča med neidentificirane tipe ECM.

Pri vzorcu 3 (preglednica 16) smo po primerjavi sekvenc z bazami podatkov dobili dva možna rezultata, *Scleroderma areolatum* in *Scleroderma verrucosum*. Obe vrsti imata zelo visok odstotek podobnosti (99 %), zato na osnovi teh podatkov ne moremo sklepati, katera

od obeh vrst je prava. V ta namen smo izdelali filogenetsko drevo za rod *Scleroderma* (Priloga 3C). Vzorec 3 se v dendrogramu uvrsti med vrste *Scleroderma areolatum*. V skupini (grozdu) vrste *S. areolatum*, kamor se uvrstita tudi naša vzorca (9_014_BU109 in 3_008_BU53), je uvrščena tudi sekvenca EU784416, ki je klasificirana kot *S. verrucosum*. Ker večina sekvenc *S. verrucosum* in *S. areolatum* tvori jasno ločena in koherentna grozda, je možno, da so avtorji objave EU784416 napačno identificirali dotično glivo na osnovi morfološko-anatomskih kriterijev.

Vsa pomnožena zaporedja ektomikoriz v rizotronih iz rodu *Tuber* (sekvence 6, 7, 11 in 21) so identična. Iz tega sklepamo, da gre za isti tip ektomikorize, kljub opaženim razlikam na anatomsko-morfološkem nivoju. Za rod *Tuber* sp. smo izdelali filogenetsko drevo (Priloga 3E) iz katerega ne moremo sklepati za katero vrsto gre, saj vzorci tvorijo ločeno grozd, ki filogenetsko sodi v skupino t.i. malih belih gomoljik, ki so v bazi podatkov GenBank zastopane pretežno z vrstno neklasificirani vzorci iz rodu *Tuber*. Najbolj sorodna grozda tako predstavljajo neidentificirano skupino vzorcev blizu vrsti *T. pacificum*, ki geografsko izhajajo iz Severne Amerike (nukleotidna zaporedja z akcesijami FJ008030, DQ420631, EU563484, AY634174 in FJ807981) in Mehike (EU563484), ter večjo skupino neizoliranih vzorcev iz rodu *Tuber* z različnimi geografskimi porekli, blizu vrsti *T. borchii*. Možnih virov inokulumov za neznano ektomikorizo iz rodu *Tuber* v drevesnici je več, saj smo v neposredni bližini gredic, na katerih so rastle bukvice, pred izkopavanjem opazili več ektomikoriznih vrst (*Carpinus betulus*, *Quercus rubra*) in tujerodno vrsto, ki tvori arbuskularno mikorizo, *Juglans nigra*. Drevesa so bila sajena v letu 1963, njihov izvor pa ni znan (podatek Drevesnice Omorika). Ker gre za odrasla drevesa z dobro razvitim koreninskim sistemom, lahko sklepamo, da je prišlo do infekcije korenin bukvic tudi z inokulumom omenjenih dreves neznanega porekla (Grebenc, os. kom.).

Prva razvita začetna oligonukleotida za pomnoževanje glivne DNK s PCR reakcijo sta bila ITS1 in ITS4, za pomnoževanje ribosomalne gene regije 5,8 S, ter območje med majhno in veliko ribosomalno podenoto (White in sod., 1990, cit. po. Kendall, 2005). Začetna oligonukleotida sta poleg širokega spektra glivne DNK, pomnoževala tudi DNK izolirano iz drugih organizmov, med drugim tudi iz rastlinskih gostiteljskih organizmov (Kendall,

2005). Pri odvzemanju koreninskih vršičkov za ekstrakcijo DNK, smo v treh primerih (vzorec *SLO_IS_005_BU94_S*, *SLO_IS_003_BU60_S* in *SLO_IS_006_BU112_S*) skupaj s koreninskim vršičkom v pufer verjetno prenesli tudi delce substrata. Pri ekstrakciji DNK smo poleg mikorizne DNK tako izolirali tudi DNK gliv, ki se nahajajo v substratu in DNK gostiteljske rastline, saj se ektomikorizne glive razraščajo po površini koreninskih vršičkov gostiteljskih rastlin. Pri petih vzorcih smo po pomnoževanju s PCR in uporabo ITS1 in ITS4 začetnih oligonukleotidov, na gelu dobili dve ali tri proge (slika 4). Ker vsaka proga pomeni pomnožek ITS1-5,8S rDNK-ITS2 druge dolžine in tako svoj unikaten organizem, smo po analizi in primerjavi sekvenc dobili več različnih organizmov. Zaporedja sekvenc iz prog 6, 7, 4* in 5* (slika 4) so po primerjavi s sekvencami iz baze podatkov kazala enako podobnost z gostiteljsko rastlino *Fagus sylvatica* L., zaporedja sekvenc iz prog 3* in 4B* pa podobnost z organizmi, ki jih navadno izoliramo iz okolja (environmental samples) in jih uvrščamo v red *Helotiales* in *Sebacinales*. V tleh poleg mikoriznih gliv živijo še drugi organizmi, ki imajo pomembno ekološko vlogo. To so lahko organizmi, ki z rastlino živijo v simbiozi (Killham, 1994), ali pa gre za druge organizme v tleh, npr. razkrojevalce, ki so pomembni za kroženje snovi v naravi. Omenjene organizme smo v substrat prenesli na koreninskih sistemih sadik bukve, saj majhnih organizmov s spiranjem pod vodo ne moremo odstraniti. V ekstrakcijski pufer smo jih najbrž prenesli s substratom, ki je bil na površini ECM gliv in ga nismo dobro odstranili.

Poleg nespecifičnih glivnih začetnih oligonukleotidov (ITS1 in ITS4), smo za pomnoževanje DNK uporabili tudi specifične glivne začetne oligonukleotide (ITS1-f), ki izključujejo možnost pomnoževanja rastlinskih genov (Gardes in Bruns, 1993, cit. po Kendall, 2005). Začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4 sta poleg glivne DNK pomnožila tudi rastlinsko DNK, kar je dalo več prog na elektroforetski sliki. Po pomnoževanju z ITS1-f in ITS4 smo povsod dobili le po eno progo na gelu. Vemo, da je proga predstavljala glivno DNA, ker smo uporabili specifične začetne oligonukleotide. To, da smo dobili le po eno progo pa je zgolj naključje oziroma posledica odvzemanja vzorcev za ekstrakcijo, saj bi lahko tudi ta dva začetna oligonukleotida pomnožila več različnih glivnih DNK in na gelu bi posledično imeli več prog, kot v primeru ko smo uporabili ITS1 in ITS4.

Zaporedje sekvence 2 oziroma vzorca *SLO_IS_005_BU94_S* (preglednica 16), je po primerjavi z bazami podatkov kazalo najbližjo podobnost s predstavniki redu *Hypocreales*, ki jih tako kot predstavnike redu *Sebacinales* in *Helotiales*, najpogosteje izoliramo iz okolja. Zato sklepamo, da smo med ekstrakcijo izolirali le DNK iz substrata, ki se je držal koreninskega vršička, ali pa se DNK ektomikorizne glive med PCR reakcijo ni pomnožila. Vzrok za to je lahko v tem, da začetni oligonukleotidi niso nalegali na DNK, ali pa uporabljeni začetni oligonukleotidi ne omogočajo pomnoževanja ITS1-5,8S rDNK-ITS2 te glive.

5.1.2 Pojavljanje tipov ektomikorize na sadikah bukve iz pilotnega poskusa

V celotnem poskusu smo tipe ECM identificirali pri 51 koreninskih vršičkih na sadikah bukve. Največkrat smo mikorizo identificirali v poskusu, kjer smo sadike bukev izpostavili temperaturi 15-20° C in kjer smo predel korenin dodatno ohlajali (slika 16). Ebert (1996, cit. po Grebenc, 2005) ugotavlja, da so optimalni pogoji za uspešno produktivnost in vitalnost bukve, povprečna letna temperatura 8° C in več kot 800 mm padavin. Optimalni pogoji za bukev dobro vplivajo tudi na razvoj ektomikorize, kar smo dokazali pri poskusu 2 (15-20° C z dodatnim hlajenjem korenin). Če oba partnerja v mikorizi živita v optimalnih razmerah, bo njun razvoj potekal hitreje in bo izmenjava snovi bolj učinkovita. 23,5 odstotkov ektomikoriznih gliv smo identificirali pri sadikah bukve, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C in kjer koreninskega predela nismo dodatno ohlajali (slika 16). Enak odstotek ECM (slika 16) smo identificirali pri poskusu s povišano temperaturo. Najmanj ECM smo identificirali v kontrolnem poskusu (slika 16). Pri tem moramo upoštevati, da je delež odmrlih in vitalnih sadik v posameznem poskusu različen in da smo koreninske sisteme odmrlih sadik temeljito pregledali pod lupo, koreninske sisteme vitalnih sadik pa s prostim očesom v pol odprti kaseti. Zato je na videz delež ECM na vitalnih sadikah manjši, kot na odmrlih sadikah (slika 19). Tako razporeditev gliv na odmrlih oziroma na vitalnih sadikah bi lahko v primeru vzorčenja tipov ECM po enaki metodi razlagali s teorijo o glivah kot razkrojevalcih v naravi. Ko drevo odmre, je možno, da ektomikorizne glive, ki sicer živijo v simbiozi z drevesom, izkoristijo odmrle korenine kot vir hrane in se posledično obnašajo kot saprofiti. Ker smo tipe ECM identificirali po

dveh različnih metodah (z lupo in s prostim očesom), je večji delež ECM gliv na odmrlih sadikah, kot na vitalnih sadikah, posledica vzorčenja.

Ektomikorizne glive, ki smo jih identificirali, so z ekološkega vidika precej raznolike. Rod *Hebeloma* je zelo heterogen. Vrste lahko tvorijo ektomikorizo ali arbuskularno mikorizo. Posamezni predstavniki v ekosistemu vršijo vlogo saprofitov in tako živijo brez simbioze z rastlinami, spet druge, tako imenovane »ammonia« glive, tvorijo trose na tleh, ki so bila tretirana z ureo ali amoniakom (Marmeisse in sod., 1999). V pilotnem poskusu se je *Hebeloma* pojavila največkrat. Eden od razlogov je, da tvori ECM, drugi pa bi lahko bil ta, da smo izolirali saprofitske predstavnike rodu *Hebeloma* iz odmrlih korenin. *Hebeloma* sp. se namreč v našem poskusu izrecno pojavlja le na koreninskih sistemih odmrlih sadik, vendar moramo upoštevati, da je morda to posledica načina vzorčenja. Predstavniki rodu *Tuber* se pojavljajo na apnenčastih tleh, kjer je pH tal med 7 in 8 ali več. Redke predstavnike najdemo v nekoliko bolj zakisanih tleh. Pretežno jih najdemo v revnih tleh zmerne pasu. Majhne spremembe v vodnem potencialu, pH in koncentraciji hranil oziroma ionov v tleh, lahko pospešijo razširjanje ene vrste in zavrejo razširjanje druge (Pacioni in Comandini, 1999). V pilotnem poskusu smo predstavnike rodu *Tuber* identificirali pri poskusih 1 in 2. Predstavnike rodu *Scleroderma* smo identificirali samo v poskusu 1. Jeffries (1999) navaja, da predstavniki rodu *Scleroderma* pogosto kolonizirajo mlade koreninske sisteme, kar se sklada z našimi ugotovitvami, saj so koreninski sistemi sadik iz pilotnega poskusa bili mladi. Redke vrste lahko razvijejo mikorizo na območjih s povišano temperaturo, tudi do 30° in zaradi tega bi rod *Scleroderma* lahko bil tudi pionirski. Kljub temu, da je bil poskus 3 izpostavljen zelo visokim temperaturam, tudi do 50° C, ne moremo podpreti trditve, ker na koreninskih sistemih nismo identificirali nobenega predstavnika iz rodu *Scleroderma*. Poleg tega, so vse sadike iz poskusa 3 odmrle. Pri odmrlih sadikah bukve iz poskusa 3 smo identificirali *C. geophilum*, ki ga najdemo v zelo različnih območjih. Za *C. geophilum* je znano, da je rezistenten na sušo, da razvije ECM v območjih z nizkim vodnim potencialom in da tvori ECM z mnogimi rastlinskimi partnerji (Lobuglio, 1999). *C. geophilum* smo identificirali na sadikah, ki smo jih izpostavili zelo visoki temperaturi, kar, glede na prej omenjene lastnosti te glive, ne preseneča. Na koreninskih sistemih sadik kontrolnega poskusa, smo identificirali tri tipe ECM, *H. sacchariolens*, *P. ostracoderma* in *L. orchidicola* (slika 18). Vse tipe ECM smo

opazili na odmrlih sadikah bukve (priloga D4). Na koreninskih sistemih sadik, ki smo jih postavili v komoro s 15-20° C, smo identificirali največ tipov ECM, in sicer na vsakem od obeh poskusov po štiri tipe ECM (slika 18). V obeh smo opazili *H. sacchariolens*, *P. ostracoderma* in *Tuber* sp. V poskusu, kjer smo predel korenin dodatno ohlajali, smo opazili še *L. orchidicola*, v poskusu, brez dodatnega ohlajanja pa *S. areolatum*. Na koreninskih sistemih sadik, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi smo identificirali le dva tipa ECM, in sicer *H. sacchariolens* in *C. geophilum* (slika 18).

Posamezni tipi ECM, se v poskusih večkrat pojavijo. Največkrat smo identificirali *H. sacchariolens* (priloga D). Med poskusi prihaja do razlik v številu, kot tudi v vrstni sestavi ektomikoriznih gliv (slika 18, priloga D). Po vrstni sestavi sta si najbolj podobna poskusa, ki smo ju izpostavili temperaturi 15-20° C. Razlog je verjetno ta, da so pogoji v obeh poskusih enaki, če zanemarimo dodatno ohlajevanje koreninskega predela v enem od poskusov. Podobno vrstno sestavo ima tudi kontrolni poskus s po tremi predstavniki ECM. Najbolj odstopa poskus, kjer smo povišali temperaturo, saj ima z ostalimi tremi poskusi le enega skupnega predstavnika (*H. sacchariolens*). *C. geophilum* se je verjetno razvil v fazi, ko se je prst zaradi previsokih temperatur okolice in premalo vode v substratu osušila, saj je zanj značilno da se pojavlja tam, kjer prevladuje suša (LoBuglio, 1999; di Pietro in sod., 2007; Paradi in Baar, 2006).

Poleg tega, da se ektomikorizne glive nahajajo na koreninskih vršičkih gostiteljskih rastlin, jih lahko izoliramo tudi iz substrata, v katerem je posajena sadika z razvito ektomikorizo. V substratu se namreč nahajajo različni vegetativni in reprodukativni deli ektomikoriznih gliv (Pohleven, 2009), kot so hife, rizomorfi in trosi. To smo v diplomskem delu dokazali z metodo DGGE za tri različne predstavnike, *Tuber* sp., *P. ostracoderma* in *S. areolatum* (slika 20). Na sliki gela vidimo, da se proge posameznega tipa ECM ujemajo z eno od prog iz vzorca substrata, kar pomeni, da gre za isti organizem. Pri vzorcih iz substrata lahko opazimo večje število prog. Večje število prog pomeni večje število organizmov, to pa pomeni večjo diverziteto. Substrat je bil pred sajenjem sadik v kasete presejan in pasteriziran, zato različnih mikroorganizmov, katerih prisotnost opazimo na gelu kot številne proge, nismo mogli prenesti iz okolice. Najverjetneje smo le-te v substrat prenesli s koreninskim sistemom sadik bukve ob sajenju ali pa vse te proge predstavljajo številne

ektomikorizne glive, ki so vzpostavile mikorizno povezavo z bukvijo v času poskusa na osnovi prenosa trosov po zraku ali na druge načine (rast v ne sterilnih pogojih).

5.2 FENOFAZE NA BUKVI

Proučevanje fenoloških faz v dolgem časovnem nizu je vse pomembnejše orodje za ugotavljanje vpliva podnebnih sprememb tako na rastlinski kot živalski svet (Bergant in sod., 2002; Schieber, 2006). Schieber (2006) navaja, da temperatura okolja vpliva na hitrost razvoja listnih popkov in prvih listov, kar smo z rezultati potrdili. Sadike v poskusih 1 in 2 so bile izpostavljene enakim zunanjim rastnim pogojem (temperatura, svetloba, vlaga). Edina razlika med obema poskusoma je bila, da smo koreninski sistem sadik iz poskusa 2 dodatno hladili za 5° C, z namenom, da bi ugotovili, ali majhne spremembe v temperaturi vplivajo na rast in razvoj sadik. Spreminjanje fenofaz pri sadikah bukve iz poskusa 1, je potekalo nekoliko hitreje, kot pri sadikah iz poskusa 2, zato lahko trdimo, da že majhne razlike v temperaturi v koreninskem okolju vplivajo na rast in razvoj bukve. Vpliv majhnih temperaturnih sprememb v okolju sta raziskali tudi Vilhar in Kajfež-Bogataj (2003), ki navajata, da otoplitev za 1° C pomeni 2,4 dni zgodnejše olistanje bukve.

Glede na to, da so bile sadike iz poskusa 3 izpostavljene višji temperaturi v okolju, kot sadike iz poskusa 1 in 2, smo pričakovali, da bodo te sadike olistale prve, dejansko so olistale kasneje kot sadike v poskusu 1 in 2. Na hitrost olistanja pri rastlinah poleg temperature vpliva količina padavin, predvsem na območjih, kjer rastlinam med vegetacijsko dobo primanjkuje vode in je voda omejujoč dejavnik rasti (Vilhar in Kajfež-Bogataj, 2003). Možno je, da so bile sadike v poskusu 3, v začetku vegetacijske sezone, premalo zalite, oziroma, da je bila vlaga v substratu premajhna in da je to vplivalo na zapoznel razvoj listov na sadikah. Majhna vlažnost v tleh omejuje fotosintezo pri rastlinah, kar vpliva na slabše olistanje oziroma na oslabeledo rast poganjkov in listov (Sass, 1993, cit. po Prislan, 2007; Nielsen in Jørgensen, 2002). Da je zmanjšana količina vlage v substratu vplivala na zapoznelo olistanje pri sadikah v poskusu 3 ne moremo trditi z gotovostjo, ker v začetku vegetacijske sezone (marec-maj), nismo merili vlage v substratu.

Kot zadnje so olistale sadike iz poskusa 4. Razlog za to pripisujemo nizkim temperaturam od marca do junija in senčni legi, kamor je postavljen zaboj s sadikami. V prvi polovici maja 2010 je bila povprečna temperatura zraka 14,1° C (ARHIV-Dnevni ... , 2010), kar je za 2,6° C manj kot je bila povprečna temperatura zraka v maju v zadnjih 9-ih letih (Povprečne letne ... , 2010), zato rezultate tega fenološkega popisa v let 2010 ne moremo upoštevati kot ustrezni kontrolni poskus.

Poleg abiotskih dejavnikov na rast in razvoj rastlin vplivajo tudi biotski dejavniki, na primer rastlinski hormoni (Kucera in sod., 2005), mikoriza, idr. Mikorizne povezave povečujejo rast in količino pridelka pri rastlinah, ker omogočajo večji privzem hranil, odpornost na sušo in slanost ter povečujejo toleranco proti patogenim organizmom (Raina in sod., 2000, cit. po. Zeng, 2006). Od vseh poznanih tipov mikorize sta v kmetijstvu in gozdarstvu najbolj pomembni ektomikoriza in arbuskularna mikoriza (Zeng, 2006). V sklopu diplomske naloge, vpliva ektomikoriznih gliv na razvoj bukve nismo posebej dokazovali, ker nismo naredili temeljite analize koreninskih sistemov na prisotnost ektomikoriznih tipov, saj smo morali sadike čimprej posaditi v substrat, da koreninski sistemi sadik niso bili predolgo izpostavljeni zraku. Kljub temu smo med skeniranjem korenin opazili posamezne tipe ektomikorize na koreninskih vršičkih, zato lahko predvidevamo, da ima mikoriza vpliv na rast in razvoj sadik bukve v novem poskusu.

5.3 VPLIV RAZLIČNIH TEMPERATUR NA PESTROST EKTOMIKORIZE

Ugotovili smo, da lahko majhne spremembe temperature (1° C) v okolju precej vplivajo na fenološki razvoj rastlin, kot poročajo nekateri raziskovalci (Vilhar in Kajfež-Bogataj, 2003). Poleg tega smo s poskusoma 1 in 2 želeli ugotoviti, ali imajo spremembe temperature v tleh, vpliv na pestrost ektomikorize. Z analizo koreninskega sistema sadik pilotnega poskusa smo sicer identificirali enako število ECM tipov pri obeh poskusih, vendar je bila vrstna pestrost ECM tipov različna. V obeh poskusih smo identificirali *H. sacchariolen*s, *P. ostracoderma* in *Tuber* sp. V poskusu 1 smo identificirali še *S. areolatum*, pri poskusu 2 pa *L. orchidicola*. Na vitalnih sadikah smo v poskusu 1 identificirali 3 različne tipe ECM, pri poskusu 2 pa le enega, vendar moramo pri tem

upoštevati, da so v poskusu 2 bile le 3 vitalne sadike, v poskusu 1 pa 11. Če bi bilo več vitalnih sadik v poskusu 2, bi bila pestrost ECM morda večja. Spremembe v temperaturi tal torej vplivajo na pestrost ECM. Na temperaturne spremembe v tleh v veliki meri poleg klimatskih sprememb vplivajo tudi antropogeni posegi v naravo oziroma človek z uporabo težke mehanizacije in s posekom gozda (Betts, 2000). Zaradi posegov v gozdne ekosisteme prihaja do razgaljenosti tal, kar vpliva na albedo. Albedo je mera za svetlobno odbojnost telesa in pove, kolikšen del vpadne svetlobe se odbije od površine (Wang, 2004). Albedo neposredno nadzoruje sevanje energije, ki se porazdeli po površini, kar vpliva na fizične, fiziološke in biogeokemične procese v ekosistemu, kot so temperatura, evapotranspiracija, energijska bilanca, fotosinteza in respiracija (Wang, 2001). Ker spremembe v fotosintezi vplivajo na procese v rastlini (Sass, 1993, cit. po Prislan, 2007), posledično vplivajo tudi na razvoj in pestrost ektomikoriznih gliv v tleh.

5.4 SKLEPI

- Pri raziskovalnem delu smo potrdili hipotezo, da se na koreninskih sistemih sadik bukve, ki jih izpostavimo različnim temperaturam, pojavljajo različni tipi ektomikorize. Najmanj ektomikoriznih tipov smo identificirali na koreninskih sistemih sadik, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi, največ pa na sadikah, izpostavljenih temperaturi 15-20° C. Potrdili smo tudi dejstvo, da temperaturni stres lahko vpliva na vrstno sestavo tipov ECM. *Cenococcum geophilum* se pogosto pojavlja na območjih, kjer je visoka temperatura in nizek vodni potencial. Tudi v našem poskusu smo ga identificirali samo na odmrlih sadikah bukve, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi.
- Za ugotavljanje pestrosti ektomikorize v raziskovalnem poskusu smo uporabili tri metode: anatomsko morfološko metodo po Agerer (1987-2008), molekularne pristope in konstrukcijo filogenetskih dreves. Po anatomsko morfološki metodi smo do vrste pravilno določili le en tip ECM, en tip ECM smo pravilno določili do rodu. Z molekularnimi pristopi smo potrdili znane in identificirali neznane tipe ECM. V dveh primerih nismo uspeli določiti ustreznega tipa ECM do vrste, zato smo nadaljevali z metodo izrisovanja dendrogramov. Z omenjeno metodo smo potrdili

znane tipe ECM in identificirali dva neznana tipa. Z anatomsko morfološko-metodo določanja tipov ECM smo določili tipe ECM do vrste le za 8 % in potrdili dejstvo, da različni pristopi pri ugotavljanju pestrosti ECM lahko pripeljejo do različnih rezultatov.

- Pri analizi številčnosti in pestrosti ektomikorize smo ugotovili, da je največ tipov ektomikorize na sadikah, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C. Na omenjenih sadikah smo v obeh poskusih skupaj identificirali kar 5 tipov ECM. Tri tipe ECM smo identificirali na sadikah kontrolnega poskusa, vendar le na odmrlih sadikah. Razlog za to je najverjetneje način odzemanja oziroma pregledovanja koreninskih vršičkov. Odmrle koreninske sisteme smo namreč pregledovali pod lupo, medtem ko smo koreninske sisteme vitalnih sadik pregledovali s prostim očesom. Najmanj tipov ECM smo po pričakovanjih identificirali na sadikah, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi.
- Hipotezo, pri kateri smo pričakovali večji delež ektomikorize na koreninskih sistemih vitalnih sadik, kot na odmrlih sadikah, na podlagi naših rezultatov ne moremo niti potrditi niti ovreči. Ektomikorizo na vitalnih sadikah smo identificirali na koreninskih sistemih sadik, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C. V kontrolnem poskusu na vitalnih sadikah nismo zabeležili niti enega tipa ektomikorize, vendar tukaj ne smemo zanemariti dejstva, da je bil substrat zelo namočen. Zato ne moremo izključiti možnosti, da se ravno zaradi namočenosti substrata ektomikoriza na koreninskih vršičkih ni razvila. V poskusu, kjer smo sadike izpostavili povišani temperaturi, nismo imeli vitalnih sadik, ker so vse sadike odmrle, zato tudi tukaj ne moremo trditi, da se ektomikoriza na vitalnih sadikah ni razvila.
- Hipotezo, v kateri smo sklepali, da se micelij ektomikoriznih gliv pojavlja tudi v substratu in ne le na koreninskih sistemih, smo potrdili.
- V sklopu diplomskega dela smo pri sadikah bukve popisali tudi fenofaze. Ugotovili smo, da stopnja olistanja pri sadikah bukve sovpada s spreminjanjem okoljske temperature. Tako so se najprej olistale sadike, ki smo jih izpostavili povišani temperaturi. Pričakovali smo, da bodo sadike kontrolnega poskusa dokaj hitro

olistale, vendar so olistale zadnje. Razloge za to iščemo v odstopanju dnevnih temperatur zraka v maju 2010, glede na povprečja v zadnjih 9-ih letih.

6 POVZETEK

Glive, ki tvorijo ektomikorizo z gozdnim drevjem, predstavljajo ključno povezovalno komponento med viri hranil ter simbiotskimi rastlinami in tako bistveno pripomorejo k delovanju ekosistema. Za razumevanje delovanja in sledenje morebitnim spremembam v opazovanem gozdnem ekosistemu je nujno poznavanje vrstne sestave partnerjev v simbiozi. Spremembe v okolju, bodisi naravne ali kot posledica človekove dejavnosti, se lahko hitro odražajo pri makro- ali mikrosimbiontih, predvsem pri glivah. V našem delu smo želeli ugotoviti vrste oziroma višje taksonomske skupine gliv, ki tvorijo ektomikorizo na sadikah bukve. Poleg tega smo želeli ugotoviti, kako spremembe temperature v okolju vplivajo na pojavljanje in pestrost ektomikoriznih gliv na sadikah bukve.

V analizo tipov ektomikorize smo vključili vse sadike pilotnega poskusa, ki smo ga zastavili spomladi 2009 in nekaj naključno izbranih sadike novega poskusa, ki smo ga zastavili jeseni 2009. Za identifikacijo tipov ektomikorize smo uporabili tri različne metode: anatomsko-morfološko metodo po Agerer (1987-2008), molekularne pristope in izrisovanje dendrogramov. S pomočjo anatomsko morfološke metode smo na kratko opisali 12 tipov ektomikorize. S pomočjo molekularnih pristopov smo en tip ektomikorize potrdili in identificirali ostale neznane tipe ECM. Kljub dovršenim molekularnim metodam dveh tipov ECM nismo uspeli identificirati, zato smo kot tretjo metodo uporabili izrisovanje dendrogramov. Skupaj smo identificirali 7 tipov ektomikorize od tega 6 na sadikah pilotnega poskusa in 1 na sadikah novega poskusa.

Na podlagi podatkov, ki smo jih dobili pri popisovanju tipov ECM na sadikah bukve, smo skušali ugotoviti, kako spremembe temperature vplivajo na pestrost ektomikorize. Ektomikoriza se najbolj optimalno razvija v okolju, ki je optimalno za oba partnerja, ki jo tvorita. Optimalna letna povprečna temperatura za rast in razvoj bukve je 8° C. Največ ektomikoriznih tipov smo identificirali na sadikah bukve, ki smo jih izpostavili temperaturi 15-20° C, ki je od vseh poskusov skupaj najbližje optimalni povprečni temperaturi 8° C, za rast bukve. Na podlagi podatkov predvidevamo, da se največ

mikoriznih povezav razvije v tistih območjih, kjer so zunanji dejavniki, kot je temperatura, najbolj optimalni za oba partnerja, ki tvorita mikorizo.

Spremembe temperature pa ne vplivajo le na pojavljanje ektomikoriznih tipov v gozdnih tleh, temveč tudi na prekinitev dormance pri rastlinah. Ugotovili smo, da se proces dormance hitreje prekine pri rastlinah, ki so izpostavljene povišani temperaturi, kot pri tistih, ki so izpostavljene nižjim temperaturam. Kljub temu, da je temperatura eden od dejavnikov, ki sodeluje pri prekinitvi dormance, sama po sebi tega procesa ne more preiniti. Poznamo namreč obdobja v zimskem času, ko so temperature lahko nekaj dni visoke potem pa zopet padejo pod 0° C. Rastline po temperaturni spremembi ostanejo v procesu dormance, saj pri prekinitvi dormance sodelujejo še drugi dejavniki, kot so hormoni (abscizinska kislina) in dolžina dneva.

Spremembe temperature v gozdnih ekosistemih so lahko globalne narave, kot predvidevajo prevladujoči scenariji klimatskih sprememb in lokalne antropogene narave, ko zaradi človekovih dejavnosti prihaja do sprememb rabe tal, kompaktiranja in razgalitve gozdnih tal, ki absorbirajo več toplote kot tla pod vegetacijskim pokrovom. Poglavitni dejavnik neto primarne proizvodnje v gozdnih tleh so organizmi v mikorizosferi, predvsem korenine in mikoriza kot ključna komponenta gozdnih talnih ekosistemov. Poudariti moramo, da majhne spremembe temperature v okolju močno vplivajo na razvoj in delovanje korenin in mikorize v tleh, s tem pa na dinamiko ogljika v gozdnem drevju in gozdnih ekosistemih. V diplomskem delu smo dokazali vplive na rast in razvoj ektomikorize v tleh. Dinamiko ogljika in pretok ogljika med organizmi pa bomo preučevali v naslednjih študijah.

7 VIRI

- Agerer R. 1991. Characterisation of ectomycorrhiza. V: Techniques for the study of mycorrhiza. J.R. Norris, D.J. Read, A.K. Varma (Eds.): *Methods in Microbiology*, 23: 25-27.
- Agerer R., Rambold G. 2004. DEEMY : an information system for determination and characterisation of ectomycorrhizae. München (Germany)
<http://www.deemy.de/> (20. apr. 2010)
- Al Sayegh Petkovšek S. 2001. Mikrobioindikacija gozdnih rastišč v Zavodnjah, Zasavju in Kočevski Reki. Letno poročilo, ERICo Velenje DP 17/02/01
<http://www.zagorje.si/dokument.aspx?id=418> (3.6.2010)
- Al Sayegh Petkovšek S. 2004. Raznovrstnost tipov ektomikorize v bukovih sestojih različno onesnaženih gozdnih ploskev. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 75: 5-19
- ARHIV-Dnevni podatki. Agencija Republike Slovenije za okolje (12. maj 2010)
<http://meteo.arso.gov.si/met/sl/app/webmet/> (26. maj 2010)
- Arnold III J. A., Verburg P. S. J., Johnson D. W., Larsen J. D., Jasoni R. L., Lucchesi A. J., Batts C. M., Christopher von Nagy, Coulombe W. G., Schorran D. E., Buck P. E., Braswell B. H., Coleman J. S., Sherry R. A., Wallace L. L., Luo Y., Schimel D. S. 2008. Prolonged suppression of ecosystem carbon dioxide uptake after an anomalously warm year. *Nature*, 455: 383-386
- Bergant K., Trdan S., Žnidarčič D., Črepinšek Z., Kajfež-Bogataj L. 2005. Impact of Climate Change on Developmental Dynamics of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): Can It Be Quantified? *Physiological Ecology*, 34, 4:755-766

- Betts R. A. 2000. Offset of the potential carbon sink from boreal forestation by decreases in surface albedo. *Nature*, 408:187-190
- Böken H., Lebert M. Soil compaction. *The Encyclopedia of the Earth*. Content.Credibility. Community. (21. 9. 2008)
http://www.eoearth.org/article/Soil_compaction (7. 6. 2010)
- Brand F. 1991. Ektomykorrhizen an *Fagus sylvatica*: Charakterisierung und Identifizierung, ökologische Kennzeichnung und unsterile Kultivierung. München, *Libri Botanici*, 2: 1-229 str.
- Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P. 1998. Application of PCR in Mycology. Cambridge, CAB international: 1-20 str.
- Chalot M., Brun A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews*, 22: 21-44
- Chung H., Zak D.R., Lilleskov E.A. 2006. Fungal community composition and metabolism under elevated CO₂ and O₃. *Oecologia*, 147: 143-154
- Colour Atlas of Ectomycorrhizae with glossary. 1987-2008. Agerer R. Department Biology I, Organismic Biology: Mycology, Universität München. Einhorn Verlag+Druck GmbH
- Courty in sod. 2010. The role of actomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 679-698
- Cudlin P., Kieliszewska-Rokicka B., Rudawska M., Grebenc T., Alberton O., Lehto T. Bakker M. R., Borja I., Konopka B., Leski T., Kraigher H., Kuyper T.W. 2007. Fine roots and ectomycorrhizas as indicators of environmental change. *Plant Biosystems*, 141, 3: 407-425

- Fang J., Lechowicz J.M. 2006. Climatic limits for the present distribution of beech (*Fagus* L.) species in the world. *Journal of Biogeography*, 33: 1804–1819
- Felsenstein J. 1985. Confidence-limits on phylogenesis-an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 4: 783-791
- Fenologija. Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje (29. mar. 2010)
http://www.arso.gov.si/vreme/napovedi_%20in_%20podatki/fenologija.pdf (15. apr. 2010)
- Fransson P.M.A., Anderson I.C., Alexander I.J. 2007. Does carbon partitioning in ectomycorrhizal pine seedlings under elevated CO₂ vary with fungal species? *Plant Soil*, 291: 323-333
- Frey-Klett P. in Garbaye T. 2005. Mycorrhiza Helper Bacteria: A Promising Model for the Genomic Analysis of Fungal-Bacterial. *Phytologist*, 168, 1: 4-8
- Gascuel O. 1997. BioNJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 685-695
- Grebenc T. 2005. Tipi ektomikorize na bukvi (*Fagus sylvatica* L.) v naravnem in gospodarskem gozdu. Doktorska disertacija. 1-24
- Grebenc T. in Kraigher H. 2007. Types of Ectomycorrhiza of Mature Beech and Spruce at Ozone-Fumigated and Control Forest Plots. *Environ Monit Assess*, 128: 47-59
- Gronbach E. 1988. Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen in einem Fichtenbestand mit Untersuchungen zur Merkmalsvariabilität in sauer berechneten Flächen. *Bibliotheca Mycologica*, 125: 25-30

- Guindon S. in Gascuel O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology*, 52: 696-704
- Guindon S., Gascuel O. 2009. PhyML - A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52, 5: 696-704
- Janssens I.A., Medlyn B., Gielen B., Laureysens I., Jach M.E., Van Hove D., Ceulemans R. 2005. Carbon budget of *Pinus sylvestris* saplings after four years of exposure to elevated atmospheric carbon dioxide concentration. *Tree Physiology* 25: 325-337
- Jeffries P. 1999. Scleroderma. V: Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profil. Cairney J. W. G. in Chambers S. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 187-189
- Kausrud H., Stige L.C., Vik J.O., Økland R.H., Høiland K., Stenseth N.C. 2008. Mushroom fruiting and climate change. *Environmental sciences*, 105, 10: 3811-3814
- Kendall J. M., Rygiewicz P. T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5, 28: 1471-2180
- Killham K. 1994. Soil ecology. Cambridge, Cambridge University Press: 62-63 str.
- Kirk J.L. in sod. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169– 188
- Kraigher H. 1996. Tipi ektomikorize – Taksonomija, pomen in aplikacije. Zbornik lesarstva in gozdarstva, 49: 33-66
- Kraigher H. 1999. Diversity of Types of Ectomycorrhizae on Norway Spruce in Slovenia. *Phyton*, 39, 3: 199-202

- Kraigher H., Agerer R. in Javornik B. 1995. Ectomycorrhizae of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterized by anatomical and molecular tools. *Mycorrhiza*, 5: 175-180
- Kraigher H., Batič F. in Agerer R. 1996. Types of Ectomycorrhizae and Mycobioindication of Forest Site Pollution. *Phyton*. Vol.36. 115-120
- Kraigher H., Petkovšek S., Grebenc T., Simončič P. 2007. Types of Ectomycorrhiza as Pollution Stress Indicators: Case Studies in Slovenia. *Environ Monit Assess*, 128: 31-45
- Kucera B., Cohn M. A., Leubner-Metzger G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15: 281-307
- LoBuglio K. F. 1999. *Cenococcum*. V: Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profil. Cairney J. W. G. in Chambers S. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 296-299
- LoBuglio K. F., Berbee M. L., Taylor J. W. 2002. Phylogenetic Origins of the Asexual Mycorrhizal Symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and Other Mycorrhizal Fungi among the Ascomycetes. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 6, 2: 287-294
- Marmeisse R., Gryta H., Jargeat P., Fraissinet-Tachet L., Gay G., Debaud J.-C. 1999. *Hebeloma*. V: Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profil. Cairney J. W. G. in Chambers S. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 90-91
- Mreža fenoloških postaj v Sloveniji. Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje (29. mar. 2010)
http://www.arso.gov.si/vreme/napovedi_%20in_%20podatki/feno_postaje.html (15. apr. 2010) (Mreža fenoloških postaj v Sloveniji-slika)
- Napoved za letalstvo, sončni vzhod in zahod. Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje (29. mar. 2010)

- http://www.arso.gov.si/vreme/napovedi_%20in_%20podatki/letalstvo.html (15. apr. 2010)
- Nielsen C. N., Jørgensen F. V. 2002. Phenology and diameter increment in seedlings of European beech (*Fagus sylvatica* L.) as affected by different soil water contents: variation between and within provenances. *Forest Ecology and Management* 174: 233-249
- Norby R.J., Luo Y. 2004. Evaluating ecosystem responses to rising atmospheric CO₂ and global warming in a multi-factor world. *New Phytologist*, 162: 281-293
- Pacioni G. in Comandini O. 1999. Tuber. V: *Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profil.* Cairney J. W. G. in Chambers S. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 165-166
- Paradi I., Baar J. 2005. Mycorrhizal fungal diversity in willow forests of different age along the river Waal, The Netherlands. *Forest Ecology and Management*, 237 : 366–372
- Pohleven F. Patologija in zaščita lesa. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo. (12.11.2009)
http://www.etocka.si/lesarstvo/dokumenti/zapiski/Patologija_zascita_lesa.pdf (17.6.2010)
- Poljanec A., Ficko A. in Bončina A. 2010. Spatiotemporal dynamic of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in Slovenia. *Forest Ecology and Management*, 259: 2183–2190
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25: 1253-1256
- Povprečne letne in mesečne temperature zraka po meteoroloških postajah, Slovenija. Statistični urad Republike Slovenije. (12. maj 2010)
http://www.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156101S&ti=Povpre%E8ne+letne+in+mese_%E8ne+temperature+zraka+po+meteorolo_%9Akih+postajah

[%2C+Slovenija&path=../Database/Okolje/01_ozemlje_podnebje/10_01561_podnebni_kazalniki/&lang=2](#) (26. maj 2010)

Prislan P. 2007. Nastajanje lesa pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.) v rastni sezoni 2006. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 14 str.

Puppi G. 2007. Origin and development of phenology as a science. Italian Journal of Agrometeorology, 3: 24-29

Püttsepp Ü., Rosling A., Taylor A. F. S. 2004. Ectomycorrhizal fungal communities associated with *Salix viminalis* L. and *S. dasyclados* Wimm. clones in a short-rotation forestry plantation. Forest Ecology and Management, 196: 413-424

Rauscher T., Müller W. R., Chevalier G. in Agerer R. 1996. Tuber borchii. V Agerer R. (1987-2008) – Colour Atlas of ectomycorrhizae, plate 113. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.

Read D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystem. *Experientia*, 47: 376-391

Read D.J. in sod. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heatland and boreal forest biomes. Can. J. Bot, 82: 1243-1263

Schieber B. 2006. Spring phenology of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a submountain beech stand with different stocking in 1995–2004. Journal of forest science, 52:208-216

Sekvence za začetne oligonukleotide: Primer sequencis, Nuclear Primers - Internal Transcribed Spacer (22. okt 2002)

<http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tour/primers.html> (22. feb 2010)

Shy L., Guttenberger M., Kottke I., Hampp R. 2002. The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. *Mycorrhiza*, 12: 303-311

Simard S.W., Durall D.M. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82: 1140-1165

Skupne letne in mesečne padavine po meteoroloških postajah, Slovenija. Statistični urad Republike Slovenije. (29. mar. 2010)

<http://www.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> (15. apr. 2010)

Smith S.E., Read D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Elsevier, Academic Press: 1-3, 189-385 str.

Spletna stran NCBI: The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. (29. jan 2010)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html> (18. mar 2010)

Spletna stran programov BLAST: The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(29.jan2010)

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome
(18. mar 2010)

Spletna stran programov DEEMY: An Information System for Characterization and Determination of EctoMYcorrhizae

<http://www.deemy.de/> (3. nov 2009)

Spletna stran programov MAFFT: A multiple sequence alignment program for unix-like operating systems (2009)

<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (17. mar 2010)

Splošni podatki in dejstva o gozdovih v Sloveniji. Zavod za gozdove Slovenije (1. jun 2010)

<http://www.zgs.gov.si/slo/gozdovi-slovenije/index.html> (3. jun 2010)

Trontelj P. Filogenetske osnove biološke sistematike. Povzetek predavanj iz Molekularne evolucije. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. (2. 6. 2010)

http://web.bf.uni-lj.si/bi/zoologija/peter_trontelj/PDFs/Filogenetske%20osnove%20bioloske%20sistematike.pdf (8. 6. 2010)

Uroz S. in sod. 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Cell pres, 17: 378-387

Vilhar U., Kajfež-Bogataj L. 2003. Odvisnost med nastopom fenofaz pri bukvi in navadnem divjem kostanju v Kočevju ter povprečnimi mesečnimi temperaturami zraka v obdobju od leta 1961 do 1990. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 72: 63-81

Wang S. 2001. Solving Convection-Dominated Anisotropic Diffusion Equations by an Exponentially Fitted Finite Volume Method. Computers and Mathematics with Applications, 44: 1249-1265

Wang S. 2005. Dynamics of surface albedo of a boreal forest and its simulation. Ecological Modelling, 183: 447-494

Zeng R. S. 2006. Disease resistance in Plants trough Mycorrhizal Fungi induced Allelochemicals. Springer: 181-19.

Železnik P., Hrenko M., Then C., Koch N., Grebenc T., Levanič T., Kraigher H. 2007. CASIROZ: Root Parameters and Types of Ectomycorrhiza of Young Beech Plants Exposed to Different Ozone and Light Regimes. Plant Biology, 9: 298-308

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila vsem, ki so pomagali pri nastanku te diplomske naloge. Še posebej bi se rada zahvalila:

- mentorici prof. dr. Hojki Kraigher, da mi je omogočila opravljati diplomsko nalogo na Gozdarskem inštitutu Slovenije, za ves čas, ki mi ga je namenila ob razpravah in za nasvete pri izdelavi diplomske naloge;
- doc. dr. Samar Al Sayegh Petkovšek za hitro in temeljito recenzijo;
- dr. Grebenc Tinetu za pomoč in nasvete pri identifikaciji rodu *Tuber* sp.;
- Bajc Marku za vso pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju, za čas, ki si ga je ničkolikokrat vzel zame in za vso potrpežljivost, ki jo je potreboval pri delu z mano;
- Meliti Hrenko za pomoč pri identifikaciji ektomikorize na sadikah bukve;
- Barbari Štupar, Špeli Jagodic in doc. dr. Jožici Gričar za pomoč pri sajenju sadik bukve v rizotrone;
- Jani Janša za dobro družbo in modre nasvete, ki mi jih je delila med pisanjem diplome, hvala tudi za podatke o fenofazah na sadikah bukve;
- Mali Boštjanu za podatke o poskusu in pomoč pri ravnanju s sadikami bukve;
- Železnik Petru za vse lepe in vzpodbudne besede, ki so me prepričale, da sem prišla na GIS, za dobro vzdušje ki ga je in ga še vedno ustvarja med sodelavci ter za pomoč pri skeniranju korenin s programom WinRhizo[®];
- dr. Čater Matjažu za opravljene meritve intenzitete svetlobe;
- staršema, da sta mi omogočila študij biologije, da sta med študijem podpirala moje pravilne odločitve in mi pametno svetovala pri malo manj pametnih odločitvah;
- sestri preprosto zato ker jo imam, ker je res nekaj posebnega in ker ima nekakšen magičen vpliv name in na moje delo;
- Mateju za to, da je bil vedno ob meni, da mi je pomagal, da me je spodbujal in da je v moje življenje vnesel smisel, del katerega je tudi ta diploma;
- nazadnje bi se rada zahvalila še vsem sošolcem in prijateljem, še posebej Primožu, Sašotu in Katji, ki so bili z mano in prenašali mojo paniko, ki se je pojavila ob vsakem majhnem ali velikem dogodku.

PRILOGE

PRILOGA A

Tipi ektomikorize, ki smo jih določili po anatomsko morfološki metodi

Tip	Opis	Razraščanje in oblika, dolžina ECM, premeri osi	Površina, obarvanost	Izhajajoči elementi	Anatomija plašča-zunanji sloj	Anatomija plašča- notranji sloj	Anatomija izhajajočih elementov	Anatomija rizomorfo v	Barvne reakcije z reagenti
SLO_IS_ 001_BU64_S		Enostavna, kroglaste oblike	Gladka, sijoča, snežno bele barve	Nismo opazili	?	?	Nismo opazili	Nismo opazili	Nismo opravili
SLO_IS_ 003_BU60_S		Enostavna, ravna, dolžina ECM do 0.5 mm, premer glavne in stranskih osi 0.15-0.17 mm	Groba, temno rjave barve, tudi črne, apeks enake barve	Hife	Zvezdasti, tip G po Agerer 1987- 2002	Zvezdasti, tip G po Agerer 1987-2002	Hife so številne, najdemo jih v zgornji tretjini ECM, kjer izraščajo pravokotno na ECM	Nismo opazili	Nismo opravili
SLO_IS_ 005_BU94_S		Enostavna, ukrivljena, dolžina ECM do 6 mm, premer glavne in	Groba, s posameznimi skupki substrata, ki dajejo	Nismo opazili	Plektenhimatski, tip E po Agerer 1987-2002	Plektenhimatski, tip E po Agerer 1987-2002	Nismo opazili	Nismo opazili	Nismo opravili

		stranskih osi 0.18-0.20 mm	svetlikajoč videz, oker do rjave barve						
SLO_IS_ 006_BU112_S		Enostavna, ravna do rahlo ukrivljena, dolžina ECM do 6 mm, premer glavne in stranskih osi 0.12-0.21 mm	Groba, svetlikajoča zaradi delcev substrata na površini, rjave barve, apeks enake barve, lahko je nekoliko temneje obarvan	Nismo opazili	Plektenhimatski , tip E po Agerer 1987-2002 s posameznimi kratкими segmenti	Plektenhimatski	Nismo opazili	Nismo opazili	Nismo opravili
SLO_IS_ 007_BU112_S		Iregularni pinatni, ukrivljena, dolžina ECM do 1 cm, premer glavne in stranskih osi 0.09-0.21 mm	Groba, nagubana, izgleda stara, posušena, na površini delci substrata, ki dajejo rumenkasto barvo osnovni oker rjavi barvi, apeks je temno rjavo	Nismo opazili	Prehoden tip med tipom H in L po Agerer 1987-2002	Pseudoparenhimatski, tip L po Agerer 1987- 2002	Nismo opazili	Nismo opazili	Nismo opravili

			obarvan						
<i>Tuber sp. 1</i> SLO_IS_ 011_BU30_S		Enostavna, ravna, lahko nekoliko ukrivljena, dolžina ECM do 3 mm, premer glavne in stranskih osi 0.17-0.35 mm	Gladka, svetlikajoča, iz nje ježasto izraščajo cistide, barva površine je oker do svetlo rjava, lahko so prisotne rjave pege, apeks je nekoliko bele barve	Cistide	Pseudoparenhimat ski, hife oblikujejo mrežo iz katere izraščajo cistide, tip D po Agerer 1987-2002	Pseudoparenhimatski z epidermoidnimi celicami, tip M po Agerer 1987-2002	Ježasto izraščajo iz mikoriznega plašča, so brezbarvne, tip A po Agerer 1987- 2002	Nismo opazili	Nismo opravili
<i>Tuber sp. 2</i> SLO_IS_ 012_BU7_S		Enostavna, ravna, dolžina ECM do 5 mm, premer glavne in stranskih osi 0.20-0.37 mm	Gladka z ježasto izhajajočimi cistidami, rjave barve, apeks je enake barve kot ostala površina	Cistide	Pseudoparenhimat ski, hife oblikujejo mrežo iz katere izraščajo cistide, tip D po Agerer 1987-2002	Prehodni tip med pseudoparenhimatskim in plektenhimatskim, tip H po Agerer 1987-2002	Ježasto izraščajo iz mikoriznega plašča, tip A po Agerer 1987-2002	Nismo opazili	Nismo opravili
SLO_IS_ 013_BU107_S		Enostavna, ravna do rahlo ukrivljena, dolžina ECM do 3 mm, premer glavne in stranskih osi 0.17-0.26 mm	Gladka, lahko tudi groba, svetlikajoča, rjava ali oker, po površini so posamezne rjave pege, apeks enake barve	Nismo opazili	Pseudoparenhimat ski, tip L po Agerer 1987-2002	Pseudoparenhimatski, prehodni tip med tipom L in M po Agerer 1987- 2002	Nismo opazili	Nismo opazili	Sulfovanilin-nismo opazili reakcije
SLO_IS_ 014_BU109_S		Enostavna, rahlo do izrazito	Gladka, bleščeča,	Hife, rizomorfi	Plektenhimatski, tip E po Agerer	Plektenhimatski, hife imajo značilno krožno	Hife so zelo pogoste,	So pogosti, diferencira	Nismo opravili

		ukrivljena, dolžina ECM do 2 mm, premer glavne in stranskih osi 0.15-0.18 mm	bela, srebrna, bleščeča zaradi zraka, ki je ujet med prepletom hif, starejši deli svetlo rumeni do oker (zraka med hifami ni več), apeks enake barve		1987-2002	razporeditev, tip A po Agerer 1987-2002	imajo tanko steno, so neobarvane, granulirane, pogoste, preplet hif tvori plašč, vmes so ujeti zračni mehurčki, septe so brez zaponk	ni, osrednje hife so nekoliko odebeljene, imajo septe	
SLO_IS_008_BU53_J		Enostavna, rahlo do izrazito ukrivljena, lahko izgleda kot da je nalomljena, dolžina ECM do 3 mm, premer glavne in stranskih osi 0.20-0.26 mm	Gladka, bleščeča, belo srebrne barve zaradi zraka ujetega med preplet hif, ko izstisnemo zrak je površina oker rumene barve, apeks navadno svetlo rumen, na tem predelu ni zraka pod prepletom hif	Hife, rizomorfi	Plektenhimatski, tip A po Agerer 1987-2002	Plektenhimatski, tip E po Agerer 1987-2002, s posameznimi kratkimi odseki	Pogoste, nimajo zaponk, povezave med hifami tipa b ₂ po Agerer 1987-2002, posamezne zožitve hif, pred razvejitvami je celična stena odebeljena, doliporne septe, dva tipa hif: granulirane in gladke,	Pogosti, diferencirani, v sredini odebeljene hife, ravne, obdajajo jih tanjše hife, tip F po Agerer 1987-2002	Nismo opravili

							prisotne posamezne cistide tipa N po Agerer 1987-2002		
SLO_IS_009_BU50_J		Monopodialno piramidalno, rahlo do izrazito ukrivljena, dolžina ECM do 5 mm, premer glavne in stranskih osi 0.14-0.27 mm	Gladka, pogosto so na površino prilepljeni delci substrata, oker do nežno rumena, apeks je svetlo rjav, ni nujno različne barve	Hife	Parenhimatski z nepravilno oblikovanimi celicami	Plektenhimatski, tip E po Agerer 1987-2002	Redko prisotne, brezbarvne, ni zaponk, na površini hif so kristalčki	Nismo opazili	Sulfovanilin-nismo opazili reakcije
SLO_IS_010_BU45_J		Enostavno, ravna do rahlo ukrivljena, dolžina ECM do 3 mm, premer glavne in stranskih osi 0.18-0.23 mm	Gladka, svetlikajoča, redko so nanjo prilepljeni delci substrata, sive barve, na območjih kjer je prilepljen substrat je rumena do oker, obarvanost apeksa je ista	Hife	Plektenhimatski, s posameznimi kratkimi predeli, tip E po Agerer 1987-2002	Plektenhimatski, tip E po Agerer 1987-2002	Redke, tanke, brezbarvne, septirane, septe lahko imajo zaponke	Nismo opazili	Nismo opravili

PRILOGA B

Parametri za izdelavo dendrograma, ki smo jih za posamezno taksonomsko enoto izdelali s programom jModelTest 0.1

Settings:

Sample size = 667

Model selected:

Model = TVM+G

Partition = 012314

-lnL = 2589.1067

K = 74

freqA = 0.2677

freqC = 0.1958

freqG = 0.1951

freqT = 0.3414

R(a) [AC] = 1.5102

R(b) [AG] = 4.3750

R(c) [AT] = 1.6665

R(d) [CG] = 0.2831

R(e) [CT] = 4.3750

R(f) [GT] = 1.0000

Gamma shape = 0.2560

Priloga B1: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Laccaria* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

Settings:

Sample size = 807

Model selected:

Model = TIM2+I+G

Partition = 010232

-lnL = 7470.5239

K = 182

freqA = 0.2865

freqC = 0.1909
freqG = 0.1859
freqT = 0.3368
R(a) [AC] = 2.0898
R(b) [AG] = 3.3645
R(c) [AT] = 2.0898
R(d) [CG] = 1.0000
R(e) [CT] = 4.8329
R(f) [GT] = 1.0000
Gamma shape = 0.2050

Priloga B2: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Peziza* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

Settings:

Sample size = 802

Model selected:

Model = TIM3+G
Partition = 012032
-lnL = 8072.2313
K = 171
freqA = 0.1686
freqC = 0.3249
freqG = 0.2855
freqT = 0.2211
R(a) [AC] = 1.3503
R(b) [AG] = 4.2382
R(c) [AT] = 1.0000
R(d) [CG] = 1.3503
R(e) [CT] = 4.5936
R(f) [GT] = 1.0000
Gamma shape = 0.4900

Priloga B3: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Scleroderma* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

Settings:

Sample size = 676

Model selected:

Model = TIM2+I

Partition = 010232

-lnL = 2484.2914

K = 53

freqA = 0.2137

freqC = 0.2802

freqG = 0.2537

freqT = 0.2525

R(a) [AC] = 1.5230

R(b) [AG] = 1.7543

R(c) [AT] = 1.5230

R(d) [CG] = 1.0000

R(e) [CT] = 3.2269

R(f) [GT] = 1.0000

Gamma shape = 0.3330

Priloga B4: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Leptodontidium* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected).

Settings:

Sample size = 722

Model selected:

Model = TIM2ef+G

Partition = 010232

-lnL = 8207.5469

K = 122

freqA = 0.25

freqC = 0.25

freqG = 0.25

freqT = 0.25

R(a) [AC] = 1.4274

R(b) [AG] = 3.0691

R(c) [AT] = 1.4274

R(d) [CG] = 1.0000

R(e) [CT] = 4.7560

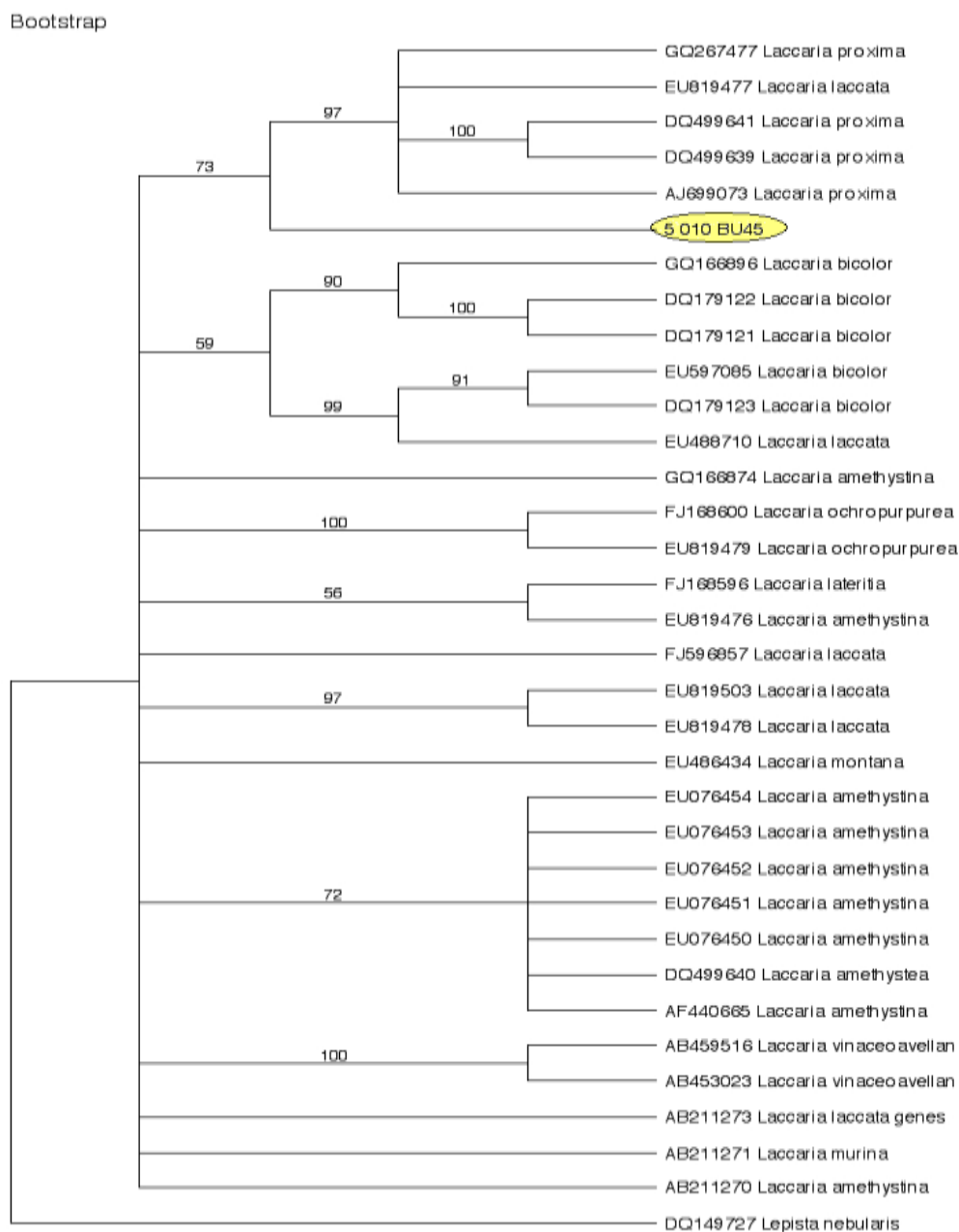
R(f) [GT] = 1.0000

Gamma shape = 0.6290

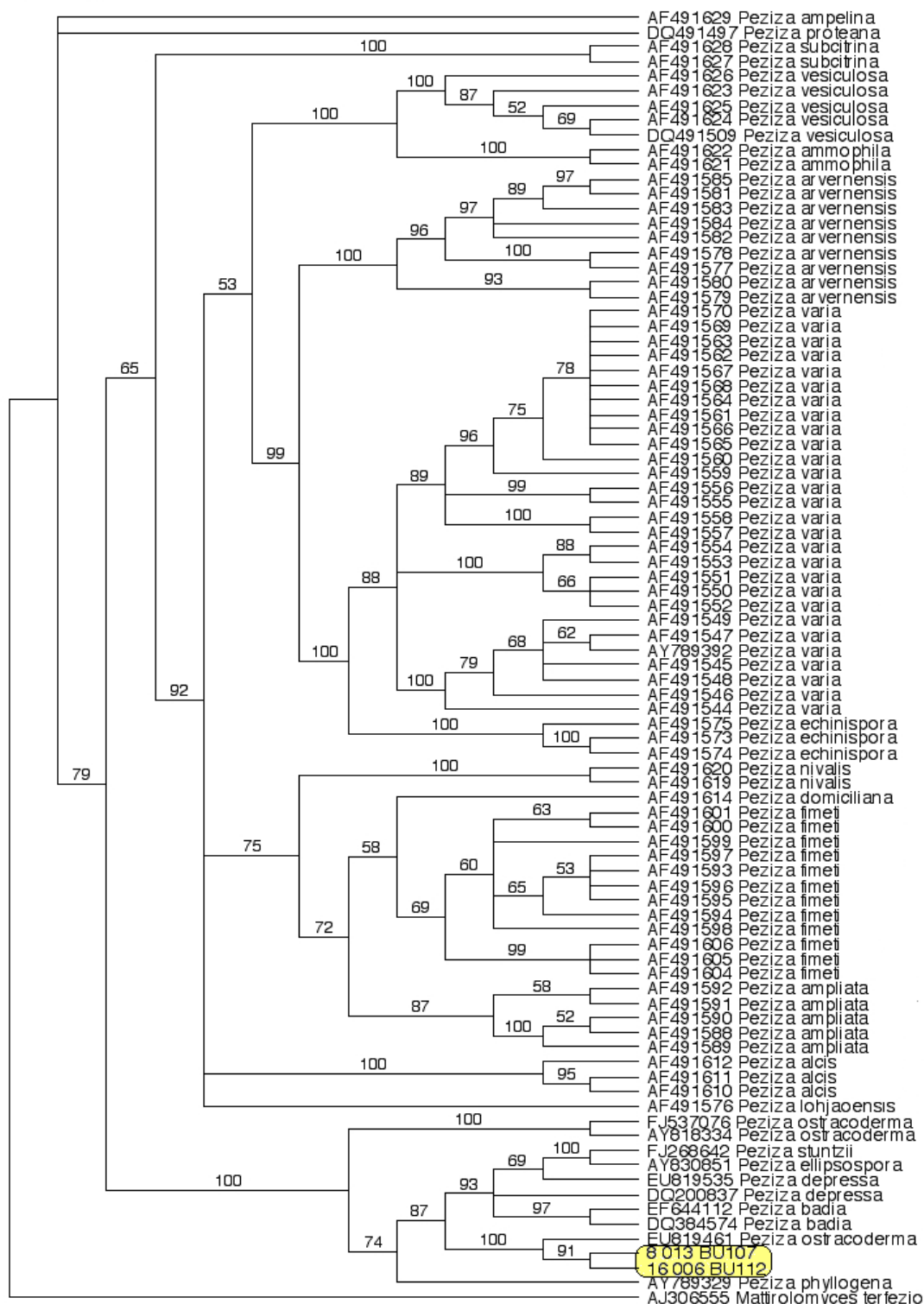
Priloga B5: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Tuber* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected)

PRILOGA C

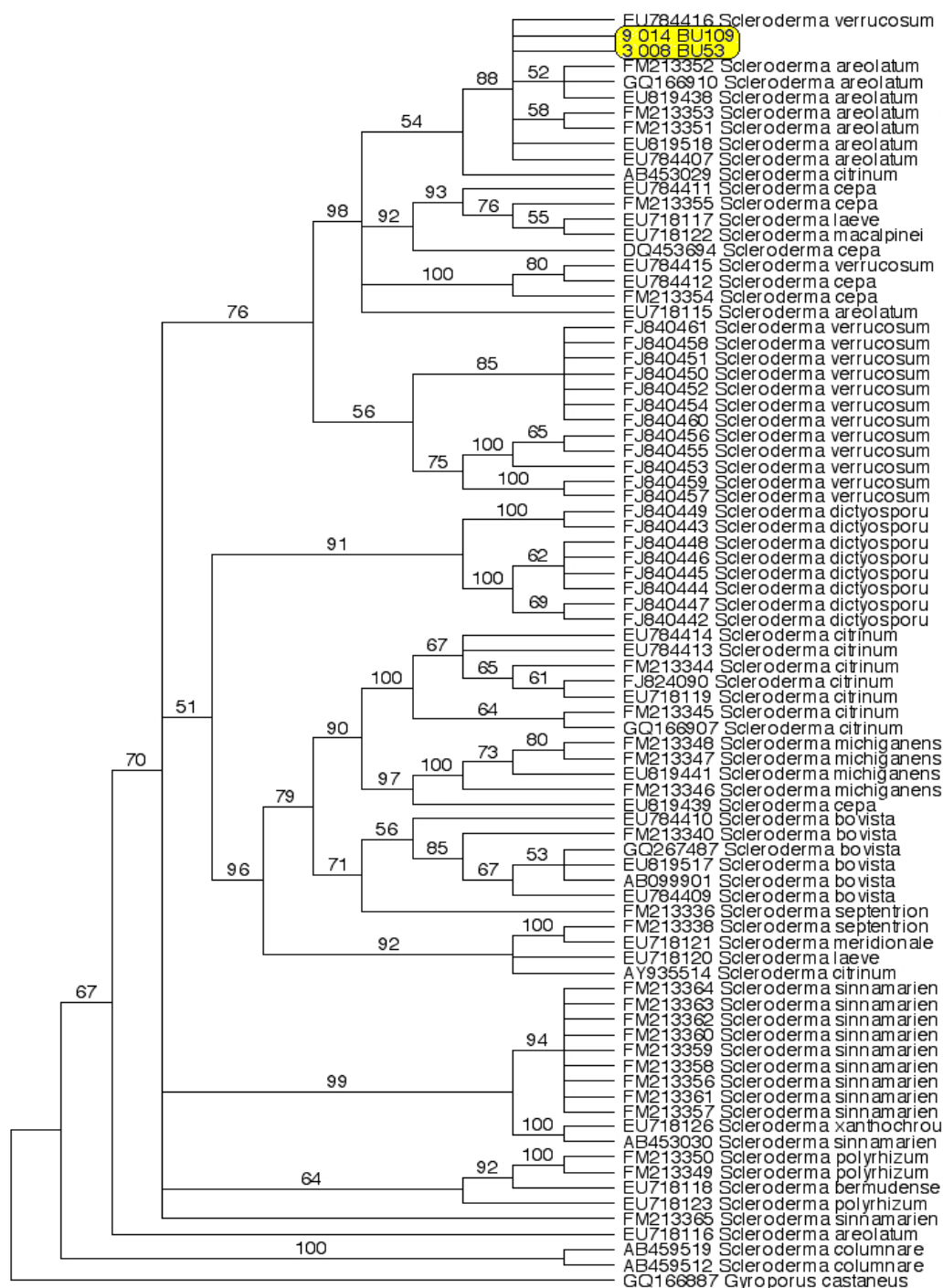
Dendrogrami, ki smo jih konstruirali v programu PAUP 4.0B10, po metodi BioNJ.



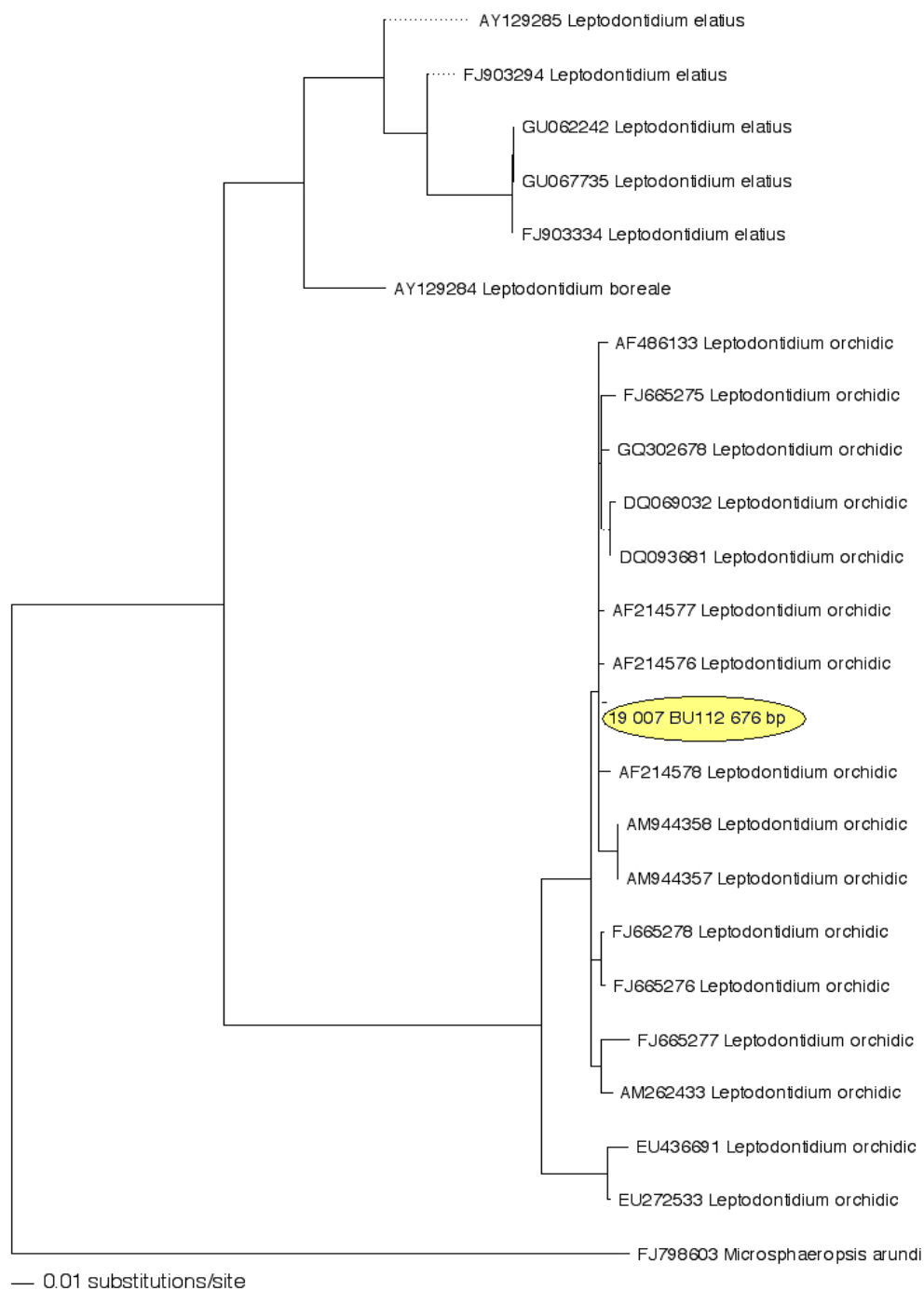
Priloga C1: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Laccaria* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc- Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).



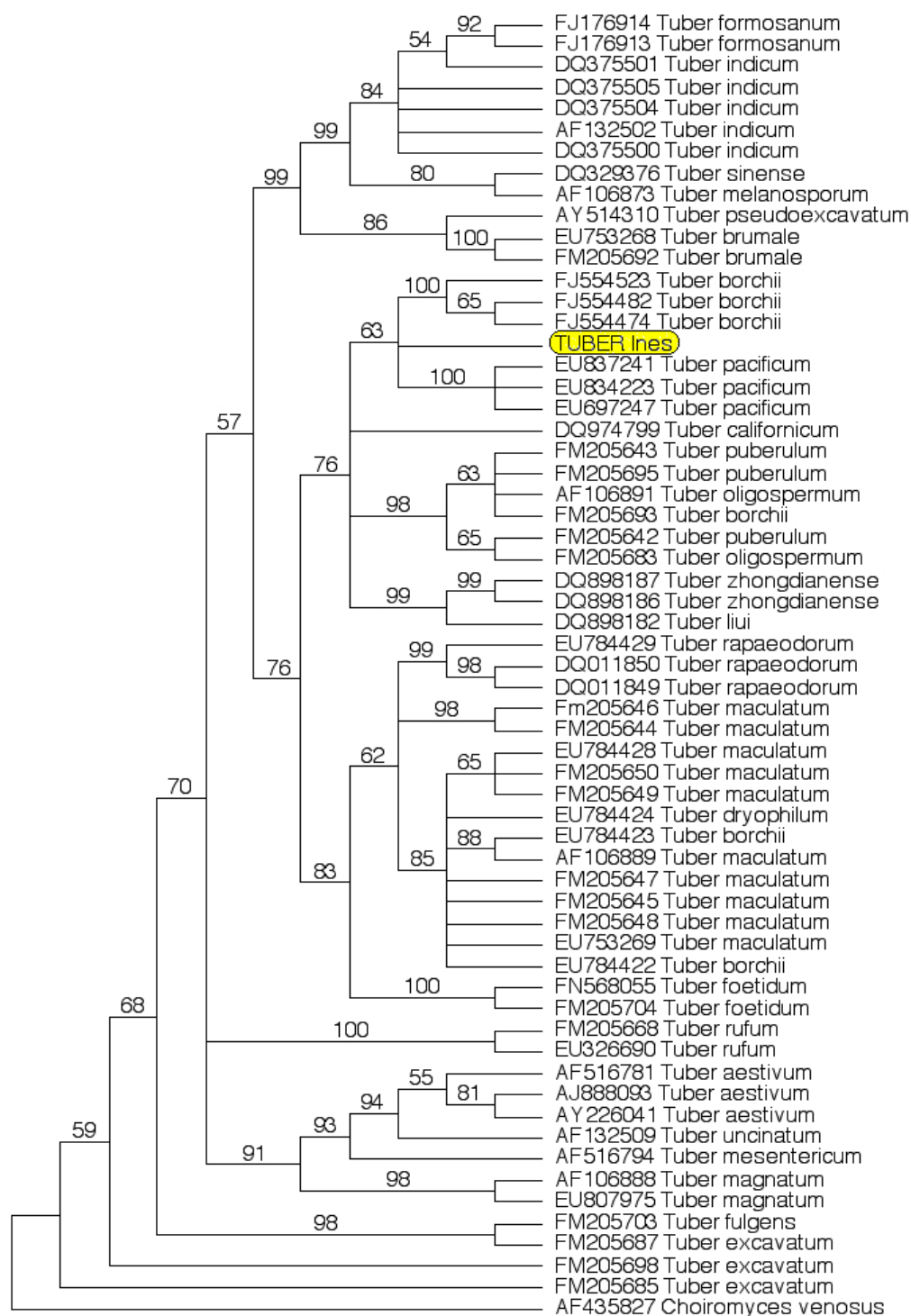
Priloga C2: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Peziza* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc- Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).



Priloga C3: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Scleroderma* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).



Priloga C4: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Leptodontidium* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).



Priloga C5: Parametri, ki smo jih za taksonomsko enoto *Tuber* izračunali s programom jModelTest 1.0, z izborom modela nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi BioNJ (2000 Bootstrap).

PRILOGA D

Pojavljanje tipov ektomikorize na sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) v pilotnem poskusu
pri štirih različni temperaturnih pogojih rasti

15-20° C, brez dodatnega hlajenja predela korenin		ZaporeDNK številka bukve	Oznaka bukve	HebSac	SclAre	LacPro	Tub sp.	PezOst	CenGeo	LepOrc	Hypocr	Sebaci	Heloti
	ODMRLE	1	BU61										
	ODMRLE	2	BU96				1						
		3	BU57	1									
		4	BU83	1									
		5	BU104	1									
		6	BU97	1									
		7	BU113	1									
	VITALNE	8	BU7				1						
		9	BU122										
		10	BU120										
		11	BU121										
		12	BU8				1						
		13	BU45										
		14	BU107					1					
		15	BU109		1		1	1					
		16	BUNN										
		17	BU78										
		18	BU99										
			Σ	5	1		4	2					

Priloga D1: Pojavljanje tipov ECM pri sadikah bukve, ki smo jih v pilotnem poskusu izpostavili temperaturi 15-20° C in kjer predel korenin nismo dodatno ohlajevali (poskus 1). V poskusu je 7 sadik odmrlo, 11 sadik je ostalo vitalnih. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

15-20° C, z dodatno hlajenim predelom korenin	ODMRLE	ZaporeDN K številka bukve	Oznaka bukve	HebSac	SclAre	LacPro	Tub sp.	PezOst	CenGeo	LepOrc	Hypocr	Sebaci	Heloti
		1	BU39										
		2	BU32	1				1					1
		3	BU37	1			1	1					1
		4	BU6	1									
		5	BU13										
		6	BU23	1				1					1
		7	BU20	1									
		8	BU51	1									
		9	BU79										
		10	BU48	1									
		11	BU17	1									
		12	BU47	1									
		13	BU26	1									
		14	BU2	1									
		15	BU49										
	VITALN F	16	BU30				1						
		17	BU9										
		18	BU10										
			Σ	11			2	3					3

Priloga D2: Pojavljanje tipov ECM pri sadikah bukev, ki smo jih v pilotnem poskusu izpostavili temperaturi 15-20° C z dodatno hlajenim predelom korenin (poskus 2). V poskusu je 15 sadik propadlo, 3 sadike so ostale vitalne. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

Sadike v rastlinjaku izpostavljene povišani temperaturi (50° C)	ODMRLE SADIKE	Zaporedna K številka bukve	Oznaka bukve	HebSac	SclAre	LacPro	Tub sp.	PezOst	CenGeo	LepOrc	Hypocr	Sebaci	Heloti
		1	BU64	1									
		2	BU65										
		3	BU46	1									
		4	BU31										
		5	BU125	1									
		6	BU103	1									
		7	BU58	1									
		8	BU56	1									
		9	BU67										
		10	BU63										
		11	BU59	1									
		12	BU98	1									
		13	BU34	1									
		14	BU92										
		15	BU66										
		16	BU123	1									
		17	BU60	1					1			1	
		18	BU75										
			Σ	11					1			1	

Priloga D3: Pojavljanje tipov ECM pri sadikah bukvic, ki so bile v pilotnem poskusu izpostavljene povišani temperaturi (poskus 3). V poskusu so se vse sadike propadle. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.

(15-20° C) z dodatno hlajenim predelom korenin	ODMRLE	Zaporedna K številka bukve	Oznaka bukve	HebSac	SclAre	LacPro	Tub sp.	PezOst	CenGeo	LepOrc	Hypocr	Sebaci	Heloti
		1	BU69	1									
		2	BU94								1		
		3	BU112	1			1	1					1
		4	BU77					1					1
		5	BU170	1									
		6	BU88	1				1					1
		7	BU70	1									
		8	BU72	1				1			1		1
	VITALNE	9	BU102										
		10	BU93										
		11	BU111										
		12	BU105										
		13	BU118										
		14	BU108										
		15	BU126										
		16	BU71										
		17	BU73										
		18	BU82										
			Σ	6			1	4			2		4

Priloga D4: Pojavljanje tipov ECM pri poskusu 4 (kontrolni poskus) v sklopu pilotnega poskusa. V poskusu je 8 sadik odmrlo, 10 sadik je ostalo vitalnih. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. LacPro-*Laccaria proxima*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*. Vzorce Hypocr-*Hypocreales*, Sebaci-*Sebacinaceae* in Heloti-*Helotiales* ne uvrščamo med ektomikorizne.