

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ines ŠTRAUS

**VPLIV TEMPERATURE IN CO₂ NA DINAMIKO
RASTI IN CELIČNO AKTIVNOST
EKTOMIKORIZNIH GLIV PRI BUKVI
Fagus sylvatica L.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ines ŠTRAUS

**VPLIV TEMPERATURE IN CO₂ NA DINAMIKO RASTI IN
CELIČNO AKTIVNOST EKTOMIKORIZNIH GLIV PRI BUKVI
Fagus sylvatica L.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**EFFECT OF TEMPERATURE AND CO₂ ON THE DYNAMICS OF
GROWTH AND CELL ACTIVITY OF ECTOMYCORRHIZAL
FUNGI OF BEECH *Fagus sylvatica* L.**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Doktorska disertacija je zaključek interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Bioznanosti, znanstveno področje znanosti o celici. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Gozdarskem inštitutu Slovenije, v laboratoriju za nevroendokrinologijo in molekularno celično fiziologijo na Inštitutu za patološko medicino Medicinske fakultete in v laboratorijih na Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung v Nemčiji.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana Regvar (BF)

Članica: prof. dr. Marina Dermastia (NIB)

Članica: doc. dr. Andreja Urbanek Krajnc (UM, FKBV)

Datum zagovora:

Podpisani/podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete

Ines Štraus

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	111.24+111.104+114.16:181.351:176.1+172.8(043.3)=163.6
KG	temperatura/CO ₂ /ektomikorizne glive/eksploracijski tipi/kisla fosfataza/ $\delta^{15}\text{N}/\delta^{13}\text{C}$ /dinamika rasti/okoljske razmere/bukev/ <i>Fagus sylvatica</i> L./rizotroni
AV	ŠTRAUS, Ines, univ. dipl. biol.
SA	KRAIGHER, Hojka (mentor)/KREFT Marko (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI	2015
IN	VPLIV TEMPERATURE IN CO ₂ NA DINAMIKO RASTI IN CELIČNO AKTIVNOST EKTOMIKORIZNIH GLIV PRI BUKVI <i>Fagus Sylvatica</i> L.
TD	Doktorska disertacija
OP	XVI, 146 str., 24 pregl., 32 sl., 5 pril., 197 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	V raziskavi smo želeli ugotoviti vpliv temperature zraka in tal ter koncentracij CO₂ tako na sadike bukve kot tudi na ektomikorizne glive (ECM). Poskus smo zastavili na enoletnih sadih bukve <i>Fagus sylvatica</i> L., posajenih v rizotrone pri različnih temperaturah: v klimatizirani komori (15-20 °C) brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) in z dodatnim hlajenjem korenin za 4-5 °C (CR+), v rastlinjaku s povišanimi temperaturami zraka (GH) in zunaj (OUT), kjer so bile sadike izpostavljene naravnim temperaturam zraka. Na sadih smo izvajali nedestruktivne analize korenin tekom poskusa in destruktivno analizo celotnih sadih ob koncu tri-letnega poskusa. Največji delež drobnih korenin, več kot 98% in najmanjši povprečni premer korenin so imele sadike v rastlinjaku. Delež mikoriznih korenin je bil v tretmajih CR+, CR- in GH med 10,3% in 11,4%, medtem ko je bilo v tretmaju zunaj za polovico manj mikoriznih korenin (5%). Za opis vplivov temperatur in povišanih koncentracij CO₂ v zraku na koreninske sisteme in nadzemni del sadih smo izračunali indekse rasti. Dokazali smo značilen ($p<0,05$) vpliv temperature tal na specifično dolžino korenin in značilno ($p<0,001$) zmanjšanje specifične površine listov in razmerja listne površine zaradi povišanih koncentracij CO₂. Mikorizne korenine smo opisali z anatomsko-morfološko metodo in nadaljevali z molekulskimi in filogenetskimi analizami identifikacije ECM. Do rodu smo identificirali 114 ECM. Z uporabo dvofotonskega konfokalnega laserskega mikroskopa in barvilom ELF-97[®] smo ugotavljali pojavljanje in aktivnost na površino vezane kisle fosfataze pri izbranih eksploracijskih tipih (CT ET, SD-ET, MD-ET, LD-ET). Dokazali smo, da je pojavljanje kisle fosfataze značilno različno ($p<0,001$) pri posameznih eksploracijskih tipih, medtem ko temperatura nima značilnega vpliva. Z izotopskimi analizami $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ v rastlinskih tkivih, mikorizi in substratu smo želeli ugotoviti tok ogljika in dušika med rastlino in glivo in vpliv okoljskih dejavnikov nanj. Potrdili smo dejstvo, da na pestrost in delovanje mikoriznih gliv vplivajo tako temperatura kot povišana koncentracija CO₂. Encimska aktivnost eksploracijskih tipov ni pogojena le z okoljskimi dejavniki, temveč tudi s funkcijo ektomikorizne glive, ki jo le-ta opravlja v celotnem sistemu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC 111.24+111.104+114.16:181.351:176.1+172.8(043.3)=163.6

CX temperature/CO₂/ectomycorrhizal fungi/exploration types/acid phosphatase/ $\delta^{15}\text{N}/\delta^{13}\text{C}$ /growth dynamics/environmental conditions/beechness/ *Fagus sylvatica* L./ rhizotrons

AU ŠTRAUS, Ines

AA KRAIGHER, Hojka (supervisor)/KREFT Marko (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty

PY 2015

TI EFFECT OF TEMPERATURE AND CO₂ ON THE DYNAMICS OF GROWTH AND CELL ACTIVITY OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI OF BEECH *Fagus Sylvatica* L.

DT Doctoral dissertation

NO XVI, 146p., 24 tab., 35 fig., 5 ann., 197 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In present study, the impact of air and soil temperature and CO₂ concentration on beech seedlings and on ectomycorrhizal fungi (ECM) was studied. The experiment was conducted on one year old beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.) planted into rhizotrons and exposed to different temperature: cooled chamber (15-20 °C) without cooling of roots (CR-) and with additional cooling of roots for 4-5 °C (CR+), greenhouse (GH) with elevated temperatures and outside (OUT).. During the experiment nondestructive analyzes were made, while in the end of tree-year experiment destructive analyzes of whole seedlings was performed. The highest proportion of fine roots, more than 98% and the lowest average root diameter were observed in GH. In CR+, CR- and GH between 10,3% and 11,4% of mycorrhizal roots were observed, while OUT were for half less mycorrhizal roots (5%). From the obtained measurements different growth parameters were recorderd. The significant impact ($p<0,05$) of root temperature on specific root length were observed and significant reduction ($p<0,001$) of specific leaf area and leaf area ratio as a consequence of elevated CO₂. Mycorrhizal fungi were identified using anatomical-morphological, molecular and phylogenetic analyzes. 114 ECM types were identified. Two-photon confocal microscope and ELF-97[®] fluorescent dye were used for establishing the activity and occurrence of surface-bound phosphatase activity in different exploration types (CT ET, SD-ET, MD-ET, LD-ET) of ECM. Occurrence of surface bound acid phosphatase was significant ($p<0,001$) between ET, while temperature had no significant effect. The $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ analyzes in different parts of plant tissues, mycorrhizal fungi and soil were used to establish nitrogen and carbon flow between fungi and host plant and the influence of environmental conditions on it. Mycorrhizal fungi are very diverse group influenced by temperature and elevated CO₂ concentrations. Enzymatic activity of exploration types depended on environmental factors and of function of ectomycorrhizal fungi that they had in the system.

KAZALO VSEBINE

.....	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation.....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	IX
Kazalo slik.....	XII
Okrajšave in simboli.....	XVI
Slovarček.....	XVII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 MIKORIZA.....	3
2.2 EKSPLOKACIJSKI TIPI (ET) KOT FUNKCIONALNE ENOTE EKTOMIKORIZNIH GLIV	5
2.2.1 Kontaktni eksploracijski tip.....	6
2.2.2 Eksploracijski tip na kratke razdalje.....	7
2.2.3 Eksploracijski tip na srednje razdalje	7
2.2.4 Eksploracijski tip na dolge razdalje	8
2.2.5 Pick-a-back eksploracijski tip.....	8
2.3 FUNKCIJE EKTOMIKORIZNIH GLIV	10
2.4 VPLIV PODNEBNIH DEJAVNIKOV NA PODZEMNI IN NADZEMNI DEL BUKVE	11
2.5 VPLIV OKOLJSKIH SPREMEMB NA EKTOMIKORIZO	14
2.6 BIODIVERZITETA EKTOMIKORIZNIH GLIV V GOZDNIH EKOSISTEMIH	16

2.7	METABOLNA AKTIVNOST MIKORIZNIH GLIV	17
2.7.1	Encimska aktivnost mikoriznih gliv	17
2.7.2	Uporaba dvofotonskega konfokalnega mikroskopa za opazovanje encimske aktivnosti.....	19
2.8	IZOTOPSKE ANALIZE OGLJIKA ($\delta^{13}\text{C}$) IN DUŠIKA ($\delta^{15}\text{N}$).....	21
2.8.1	Izotopi dušika pri mikoriznih glivah	21
2.8.2	Izotopi ogljika pri mikoriznih glivah	23
3	MATERIAL IN METODE	25
3.1	OPIS SADIK	26
3.2	POSTAVITEV POSKUSA	27
3.2.1	Sajenje sadike v rizotrone in priprava substrata.....	27
3.2.2	Opisi pogojev v tretmajih	27
3.3	NEDESTRUKTIVNA ANALIZA KORENINSKEGA SISTEMA	30
3.4	DESTRUKTIVNA ANALIZA SADIK BUKVE IN SUBSTRATA.....	30
3.4.1	Analiza nadzemnega dela sadike bukve po destruktivni analizi	30
3.4.2	Analiza koreninskega sistema – mikorizne in nemikorizne korenine.....	32
3.4.3	Analiza mikoriznih korenin – identifikacija z anatomsko-morfološko metodo	33
3.4.4	Analiza mikoriznih korenin - identifikacija gliv v ektomikorizi z uporabo molekulskih markerjev.....	33
3.4.5	Analiza mikoriznih korenin - identifikacija gliv v ektomikorizi z izdelovanjem dendrogramov.....	37
3.4.6	Analiza mikoriznih korenin - statistična analiza pestrosti ektomikoriznih gliv	38
3.4.7	Analiza združb ektomikoriznih gliv v substratu z gelsko elektroforezo v gradientu denaturantov (DGGE)	41
3.5	ANALIZA METABOLNE AKTIVNOSTI EKTOMIKORIZNIH GLIV IN MICELIJA Z DVOFOTONSKIM KONFOKALNIM MIKROSKOPOM.....	45

3.5.1	Vzorčenje in priprava vzorca za mikroskopiranje	46
3.5.2	Barvanje korenin z raztopino ELF [®] 97	46
3.5.3	Mikroskopiranje z dvofotonskim konfokalnim mikroskopom LSM 7 MP (Zeiss, Nemčija)	47
3.5.4	Analiza slik	48
3.6	ANALIZE VSEBNOSTI IZOTOPOV $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$ Z UPORABO MASNEGA SPEKTROMETRA ZA STABILNE IZOROPE	49
4	REZULTATI	50
4.1	NEDESTRUKTIVNA ANALIZA KORENINSKEGA SISTEMA S PROGRAMOM ROOTFLY [®]	50
4.2	DESTRUKTIVNA ANALIZA SADIK BUKVE IN SUBSTRATA	51
4.2.1	Analiza nadzemnega dela sadik bukve	51
4.2.2	Analiza koreninskega sistema s programom WinRhizo [®]	53
4.2.3	Delež mikoriznih in nemikoriznih korenin v poskusu	55
4.2.4	Identifikacija ektomikoriznih gliv na sadikah bukve	56
4.2.5	Kratki opisi tipov ektomikoriznih gliv	58
4.2.6	Statistična analiza pestrosti ektomikoriznih gliv	77
4.2.7	Rezultati analiz pestrosti ektomikoriznih združb v substratu z metodo DGGE (gelska elektroforeza v gradientu denaturantov)	83
4.3	REZULTATI ANALIZ ENCIMSKE AKTIVNOSTI EKTOMIKORIZNIH GLIV	88
4.4	REZULTATI ANALIZ VSEBNOSTI STABILNIH IZOTOPOV $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$..	91
4.4.1	Izotopska sestava $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vzorcev v poskusu	91
4.4.2	Primerjava rezultatov izotopske sestave $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vzorcev v sistemu rastlina-mikoriza-tla	93
4.4.3	Primerjava tretmajev glede na rezultate $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$	95
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	98
5.1	TIPI EKTOMIKORIZE NA BUKVI	98

5.2	VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA VRSTNO PESTROST EKTOMIKORIZNIH GLIV	103
5.3	VPLIV TEMPERATURE NA RASTNE PARAMETRE PRI BUKVI.....	106
5.4	AKTIVNOST KISLE FOSFATAZE (SBP) PRI EKTOMIKORIZNIH GLIVAH.....	111
5.5	IZOTOPSKA SESTAVA $\delta^{15}\text{N}$ IN $\delta^{13}\text{C}$ SADIK BUKVE IN MIKORIZNIH GLIV ODRAŽA STANJE V EKOSISTEMU	113
5.5.1	Vzorci $\delta^{15}\text{N}$	113
5.5.2	Vzorci $\delta^{13}\text{C}$	116
5.5.3	Primerjava $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti med tretmaji	117
5.6	SKLEPI	118
6	POVZETEK (SUMMARY)	120
6.1	POVZETEK	120
6.2	SUMMARY	124
7	LITERATURA.....	128
	ZAHVALA.....	147
	PRILOGE	148

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Hierarhična razdelitev mikoriznih skupin po Smith in Read (2008), z dopolnitvijo subepidermalne mikorize po Brundrett (2004).....	4
Preglednica 2: Temperature, ki omejujejo razširjenost bukve v severnih in južnih predelih Evrope (Fang in Lechowicz, 2006).....	12
Preglednica 3: Rastne razmere v tretmajih: temperatura zraka in zračna vlaga od leta 2010 do 2012, temperatura tal na globini -20 cm od leta 2010 do 2012 in koncentracije CO ₂ za leto 2011. CR+: dodatno hlajenje koreninskega predela, CR-: brez dodatnega hlajenja koreninskega predela, GH: rastlinjak, OUT: zunaj. n: število meritev	29
Preglednica 4: Reakcijska mešanica za pomnoževanje v PCR, sestavine, proizvajalci in količina za končni volumen reakcije 25 µl.	35
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in sekvenčni reakciji.....	35
Preglednica 6: PCR program za pomnoževanje ITS regij.....	36
Preglednica 7: Reakcijska mešanica za pomnoževanje v PCR, sestavine, proizvajalci in količina za končni volumen reakcije 25 µl.	42
Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in DGGE	42
Preglednica 9: PCR program, uporabljen pri pomnoževanju ITS regij.	43
Preglednica 10: Snovi in količine za pripravo akrilamidnih raztopin z 0 in 100 odstotki denaturantov.	43
Preglednica 11: Volumni 0 in 100-odstotne raztopine za pripravo denaturacijskega gradienta 20 % - 60 %.	43
Preglednica 12: Količina dodanega katalizatorja za polimerizacijo gela in skupni končni volumni posameznih raztopin.	44
Preglednica 13: Rezultati nedestruktivne analize korenin. Skupna dolžina korenin (mm) in povprečni premer korenin (mm) pri sadikah bukve.	50
Preglednica 14: Značilnosti poganjkov in listov pri sadikah bukve, ki so rastle pri različnih rastnih razmerah (povprečje ± SE). Značilne razlike so zabeležene pri p<0,05 in so označene z različnimi črkami. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; SLA: specifična listna površina, LAR: razmerje listne površine. n: število sadik.	51
Preglednica 15: Značilnosti korenin tri letnih sadik bukve, ki so rastle pri različnih razmerah (povprečna vrednost ± SE). Statistično značilne razlike (p<0,05) so označene z različnimi	

črkami. CR+: hladna soba, dodatno hlajenje korenin, CR-: hladna soba, brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; SRL: specifična dolžina korenin.	54
Preglednica 16: Delež mikoriznih in nemikoriznih korenin v posameznem tretmaju.	55
Preglednica 17: Delež posameznega tipa ektomikorize v vseh tretmajih. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; NECM: neidentificirane ECM glive, SCL: <i>Scleroderma</i> sp., TUB: <i>Tuber</i> sp., TRI: <i>Trichophaea</i> sp., PUL: <i>Pulvinula</i> sp., PEZ: <i>Peziza</i> sp., HEB: <i>Hebeloma</i> sp., CEN: <i>Cenococcum</i> sp.	78
Preglednica 18: Analiza vrstne pestrosti ECM gliv v tretmaju. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; k.k.: kratke korenine; NECM: neidentificirane ECM glive, SCL: <i>Scleroderma</i> sp., TUB: <i>Tuber</i> sp., TRI: <i>Trichophaea</i> sp., PUL: <i>Pulvinula</i> sp., PEZ: <i>Peziza</i> sp., HEB: <i>Hebeloma</i> sp., CEN: <i>Cenococcum</i> sp.	79
Preglednica 19: Izračun indeksov vrstne pestrosti mikoriznih gliv v tretmaju. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj.	80
Preglednica 20: Povprečno število lis, standardni odklon (SD) in število različnih lis v posameznem tretmaju. CR+: klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj.	83
Preglednica 21: Razlike v površini nadpražne intenzitete fluorescence (NIF) med eksploracijskimi tipi (ET) in tretmaji pri pragu 10 %. Vrednosti so izražene kot mediana ± SE v slikovnih točkah-piksel (px ²).	88
Preglednica 22: Značilne razlike med eksploracijskimi tipi izračunane z neparametričnim testom. Značilne razlike so zabeležene pri p<0,01. n: število pregledanih slik.	88
Preglednica 23: Vrednosti (povprečje ± SE) δ ¹⁵ N in δ ¹³ C za posamezne komponente v sistemu rastlina-mikoriza-substrat in posamezne eksploracijske tipe. Rezultati so izraženi v promilih (‰). LD ET: eksploracijski tip na dolge razdalje, MD ET: eksploracijski tip na srednje razdalje, SD ET: eksploracijski tip na kratke razdalje, CT ET: kontaktni eksploracijski tip. CR+: dodatno hlajenje korenin, CR-: brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; n: število vzorcev.	92
Preglednica 24: Izotopska sestava δ ¹⁵ N (levo) in δ ¹³ C (desno) izražena v ‰ vzorcev iz poskusa. CR+: klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana	

komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; L: listi, R: nemikorizne korenine, M: mikorizne korenine, S: steblo, Z: substrat 95

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz eksploracijskih tipov (ET) s prečnim prerezom ektomikorize in zunaj koreninskega micelija (Agerer, 2001: 108). 1: kontakti ET, 2: ET na kratke razdalje, 3a, b: ET na srednje razdalje, resasti podtip in pregrinjalni podtip, 3c: ET na srednje razdalje, gladek podtip, 4: ET na dolge razdalje, 5: pick-a-back eksploracijski tip; Rh: rizomorfi razviti, Rh-: rizomorfi niso razviti, A-F: tipi rizomorfov po Agerer (1987-2008).....	6
Slika 2: Energijska stanja elektronov (Hell in Wichmann, 1994: 780).....	19
Slika 3: Shema sestavnih elementov konfokalnega mikroskopa (Wilhelm in sod., 2014: 29).....	20
Slika 4: Pot dušika med ektomikoriznimi glivami, rastlino in substratom.	22
Slika 5: Pot ogljika med listi, koreninami in mikoriznimi glivami.	23
Slika 6: Organizacijska shema metod dela, ki smo jih izvajali pri doktorski nalogi.	25
Slika 7: Spreminjanje temperature in svetlobe tekom dneva v klimatizirani komori (Štraus, 2010: 21)	28
Slika 8: Shematski prikaz delovanja ELF [®] 97 (levo) in emisijski ter ekscitacijski spekter ELF [®] 97 (desno) (Johnson in Spence, 2010: 162).	47
Slika 9: Suha masa nemikoriznih korenin in poganjkov (levo) in mikoriznih korenin (desno) (povprečje ± SE) triletnih sadik bukve, ki so rastle pri različnih temperaturnih razmerah. Značilne razlike (p<0,005) so označene z različnimi črkami. Nad stolpci je prikazano povprečje razmerja med koreninami in poganjki (p=0,08). CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin (n=17). CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin (n=15), GH: rastlinjak (n=17), OUT: zunaj (n=14).	52
Slika 10: Dolžina debelinskih razredov tri letnih sadik, ki so rastle pri različnih razmerah. Korenine so razdeljene v razrede glede na premer (d). Poleg stolpcev je zapisan delež koreninskih razredov (povprečna vrednost ± SE), ki je preračunan na skupno dolžino korenin. Nad stolpci je zapisana skupna dolžina korenin (m) (povprečna vrednost ± SE) za posamezni tretma. Statistično značilne razlike (p<0,05) so označene z različnimi črkami. CR+: hladna soba, dodatno hlajenje korenin (n=17), CR-: hladna soba, brez dodatnega hlajenja korenin (n=15), GH: rastlinjak (n=17), OUT: zunaj (n=14).	54
Slika 11: Delež mikoriznih in nemikoriznih kratkih korenin v tretmaju (%). Nad stolpci so zapisani deleži (%). CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj.....	55

Slika 12: a - Ektomikorizna gliva iz rodu <i>Scleroderma</i> sp., b – plektenhimatski plašč, c - odebeljene hife	60
Slika 13: Filogenetsko drevo taksonomske enote <i>Scleroderma</i> , konstruiran po metodi Maximum likelihood (2000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumenimi pikami so označeni vzorci iz našega poskusa.....	61
Slika 14: a-ektomikorizna gliva iz rodu <i>Tuber</i> , b-pseudoparenhimatski plašč tipa M, c-cistidiji tipa A.....	62
Slika 15: Filogenetsko drevo taksonomske enote <i>Tuber</i> , konstruiran po metodi Maximum likelihood (1000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumeno piko so označeni vzorci iz našega poskusa.	64
Slika 16: a-ektomikorizna gliva iz rodu <i>Peziza</i> sp., b-notranji parenhimatski plašč, c-zunanji parenhimatski plašč	65
Slika 17: Filogenetsko drevo taksonomske enote <i>Peziza</i> , konstruiran po metodi Maximum likelihood (2000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumeno piko je označen vzorec iz našega poskusa.	67
Slika 18: a-ektomikorizna gliva iz rodu <i>Hebeloma</i> ; b-plektenhimatski plašč; c-hife z zaponkami in odebelitvami na posameznih mestih.....	68
Slika 19: Filogenetsko drevo taksonomske enote <i>Hebeloma</i> , konstruiran po metodi Maximum likelihood (2000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumeno piko je označen vzorec iz našega poskusa.	70
Slika 20: a-ektomikorizna gliva iz rodu <i>Pulvinula</i> ., b,c-zunanji plektenhimatski plašč.....	71
Slika 21: a-ektomikorizna gliva iz rodu <i>Trichophaea</i> , b-pseudoparenhimatski plašč tipa L, c-septirane hife, d-odebeljena hifa	74
Slika 22: Tip ektomikorize z vrsto <i>Cenococcum geophilum</i> Fr.....	76
Slika 23: Delež ECM gliv v celotnem poskusu (%). NECM: neidentificirane ECM glive (n=19813), SCL: <i>Scleroderma</i> sp. (n=123577), TUB: <i>Tuber</i> sp. (n=60388), TRI: <i>Trichophaea</i> sp. (n=14609), PUL: <i>Pulvinula</i> sp. (n=6300), PEZ: <i>Peziza</i> sp. (n=1343), HEB: <i>Hebeloma</i> sp. (n=924), CEN: <i>Cenococcum</i> sp. (n=6).	77
Slika 24: Delež ECM gliv v posameznem tretmaju. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; k.k.: kratke korenine; NECM: neidentificirane ECM glive, SCL: <i>Scleroderma</i> sp., TUB: <i>Tuber</i> sp., TRI: <i>Trichophaea</i> sp., PUL: <i>Pulvinula</i> sp., PEZ: <i>Peziza</i> sp., HEB: <i>Hebeloma</i> sp., CEN: <i>Cenococcum</i> sp.....	79

Slika 25: Rezultati analize PCA (angl. Principal Components Analysis) v treh dimenzijah. CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj	85
Slika 26: Rezultati analize PCA (angl. Principal Components Analysis) v treh dimenzijah glede na diskriminatorsko moč lis. Sivi krogci: lise, ki bistveno ne prispevajo k ločevanju skupin; črni trikotniki: lise, ki se v večjem deležu pojavljajo pri vseh tretmajih; rumeni trikotniki: lise poskusa zunaj (OUT), ki najbolj prispevajo k ločevanju od drugih tretmajev; modri trikotniki: lise poskusa iz komore z dodatnim hlajenjem korenin (CR+), ki najbolj prispevajo k ločevanju od drugih tretmajev. Obarvani krogci predstavljajo lise, ki se pojavljajo samo pri enem izmed tretmajev, vendar zaradi majhne pogostosti in/ali intenzitet izraziteje ne prispevajo k ločevanju tretmajev. Pri poglavitnih lisah (trikotniki) so označeni njihovi relativni položaji v gelu v odstotkih.....	86
Slika 27: Rezultati analiz po metodi »Band matching«. Na sliki zgoraj so predstavljene kvantitativne vrednosti lis, na grafu spodaj pa frekvence pojavljanja lis. CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj.....	Napaka! Zaznamek ni definiran.
Slika 28: Površina nadpražne intenzitete fluorescence pri pragu 10 % pri različnih eksploracijskih tipih (ET). Podatki so prikazani kot srednje vrednosti slikovnih točk-piksel (px ²) (mediana±SE), zgornji in spodnji kvartil (25% in 75%) ter minimalne in maksimalne vrednosti (min-max). CT ET: kontaktni eksploracijski tip, SD ET: eksploracijski tip na kratke razdalje, MD ET: eksploracijski tip na srednje razdalje, LD ET: eksploracijski tip na dolge razdalje. n: število pregledanih slik za vsak ET	89
Slika 29: Pojavljanje encimov (na površino vezane fosfataze – SBP) pri različnih eksploracijskih tipih (levo) in pri eksploracijskem tipu na dolge razdalje (LD ET) glive <i>Scleroderma</i> sp. iz različnih temperaturnih pogojev (desno). Za vsak ET in tretma je levo slika mikorizne glive z zeleno svetlobo (fluorescenco), ki označuje na površino vezano fosfatazo (SBP) in desno brez zelene svetlobe. CT ET: kontaktni eksploracijski tip, SD ET: eksploracijski tip na kratke razdalje, MD ET: eksploracijski tip na srednje razdalje, LD ET: eksploracijski tip na dolge razdalje, CR+:hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj. Merilce: 50 µm. .	90
Slika 30: Izotopska sestava δ ¹⁵ N (levo) in δ ¹³ C (desno) vzorcev iz poskusa. Podatki so izraženi v promilih (‰). CR+:hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba	

brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; L: listi, R: nemikorizne korenine, M: mikorizne korenine, S: steblo, Z: substrat 94

Slika 31: Primerjava tretmajev glede na razmerje $\delta^{15}\text{N} / \delta^{13}\text{C}$ v listih, steblo, mikoriznih in nemikoriznih koreninah. Podatki so izraženi v promilih (‰). CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj 97

Slika 32: Primerjava tretmajev glede na razmerje $\delta^{15}\text{N} / \delta^{13}\text{C}$ v substratu (Z). CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj 97

SLOVARČEK

Drobne korenine	korenine katerih premer je manjši od 2 mm
Obrat drobnih korenin	hitrost, s katero se v določenem času biomasa drobnih korenin obnovi, tj. stara biomasa odmre in se ustvari nova
Rizomorf	hife, ki so na različne načine povezane med sabo in rastejo bolj ali manj vzporedno
Ektomikorizni plašč	bolj ali manj gosto razvrščene hife, ki obdajajo korenino
Eksploracijski tipi	funkcionalne skupine, ki jih je Agerer leta 2001 opredelil glede na pojavljanje in razraščanje izhajajočih elementov, hif in rizomorfov, in so povezani z ekološko vlogo ektomikoriznih gliv v naravi.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Gozdovi pokrivajo 4 milijarde hektarov ali 30 % zemeljskega površja (Global forest ..., 2010) in skladiščijo več kot 75 % ogljika v kopenskih ekosistemih (Godbold in Brunner, 2007). Segrevanje ozračja, kot posledica podnebnih sprememb, močno vpliva na zemeljske sisteme, kot so gozdovi (Godbold in Brunner, 2007). Dinamika ogljika v gozdnih tleh je odvisna od žive komponente tal, predvsem drobnih korenin, gliv in mikroorganizmov. Pestrost in delovanje organizmov v mikorizosferi gozdnih tal je odvisna od združb nadzemnih rastlin, okoljskih parametrov ter vplivov zaradi antropogenih motenj in klimatskih sprememb. Odzivi nadzemnih delov rastlin na spreminjajoče se dejavnike v njihovem okolju so razmeroma dobro poznani, medtem ko je vpliv podnebnih sprememb na biološke komponente v tleh še precej neznan (Courty in sod., 2010).

Drobne korenine gozdnih dreves prispevajo manj kot 2 % k drevesni biomasi v odraslih sestojih, vendar veliko prispevajo k talnim zalogam C z obratom korenin, hkrati pa omogočajo drevesu privzem vode in hranil iz tal, shranjevanje fotosintetskih produktov in zagotavljajo fizično stabilnost dreves (Godbold in Brunner, 2007). Drobne korenine dreves so povezane z mikoriznimi glivami, v katere se alocira 20-30 % trenutne asimilacije C in katerih življenjski obrat (razvoj in propad) predstavlja dominantni proces (ca. 60 %) vnosov ogljika v gozdna tla. Mikorizne glive zagotavljajo prostorsko in časovno delitev vode, hranil in ogljikovih hidratov med različnimi biotskimi komponentami v gozdnem ekosistemu in podpirajo biodiverzitetu na različnih nivojih (Selosse in sod., 2006). Morfologija kratkih korenin je močno odvisna od prisotnosti različnih vrst gliv, kar pomeni, da ima mikobiont pomemben vpliv na funkcionalne lastnosti drobnih korenin. Pri gozdnem drevju v zmernih klimatih je najbolj pogosta oblika mikorize ektomikoriza (ECM), za katero so značilni plašč hif okoli drobnih korenin, labirint hif - Hartigova mreža okoli celic primarne skorje in izhajajoči elementi, hife in rizomorfi. Funkcionalna kompatibilnost mikorizne simbioze je odvisna od vrste glive in rastlinskega partnerja, torej je vrstno specifična. Poznavanje ECM tipov, njihove vrstne sestave in številčnosti je zato nujno potrebno za razumevanje delovanja gozdnih ekosistemov (Kraigher, 1996, 1999). Od leta 2001 (Agerer, 2001) poteka združevanje ektomikoriznih tipov v funkcionalne skupine (eksploracijske tipe). Poleg poznavanja ECM tipov za razumevanje funkcionalne kompatibilnosti mikorizne simbioze je

vse večji poudarek tudi na razumevanju aktivnosti mikoriznih gliv v simbiozi. Številne strukture v glivnih celicah vsebujejo encime, s katerimi povečujejo vitalnost makrobionta v simbiozi (Alvarez in sod., 2005; Vierheilig in sod., 2005), vendar metabolne poti v veliki meri še niso znane.

1.2 CILJI NALOGE IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Namen naloge je raziskati vpliv podnebnih sprememb, še posebej temperature in povišane koncentracije CO₂, na ektomikorizno združbo gliv v tleh ter na aktivnost mikoriznih gliv in micelija, s čimer bomo prispevali k razumevanju funkcionalne kompatibilnosti mikorizne simbioze in celotnega delovanja gozdnega ekosistema v spreminjajočih se podnebnih razmerah.

Z raziskavo želimo preveriti naslednje hipoteze:

- Okoljski dejavniki, kot sta temperatura in povišana koncentracija CO₂, vplivata na pestrost ECM združbe gliv na bukvi *Fagus sylvatica* L.
- Aktivnost hif izbranih vrst gliv je odvisna od abiotskih dejavnikov okolja.
- Encimska aktivnost mikoriznih gliv in hif je pri različnih eksploracijskih tipih različna.
- Različni eksploracijski tipi ECM različno vplivajo na rast nadzemnih in podzemnih delov rastlin ter na življenjsko dobo drobnih korenin.
- Dinamika ogljika v nadzemnem in podzemnem delu mikoriznih rastlin je različna pri različnih okoljskih razmerah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKORIZA

Mikorizo, kot stalno simbiozo med glivami in koreninami, je prvič imenoval Frank leta 1885 (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). Leta 1977 je Cook definiral glivne simbioze kot »vsako združitev gliv z živim gostiteljem, od katerega na različne načine pridobivajo metabolite in hranilne snovi«. Cook (1977) v definiciji ni zajel mikoriznih povezav z miko-heterotrofnimi rastlinami, ki hranilne snovi pridobivajo le od gliv in so od njih odvisne (Brundrett, 2004), medtem ko je Frank v svoji definiciji zajel miko-heterotrofne rastline, vendar izključil vse ostale povezave med rastlinami in glivami. Definicija, ki splošno opisuje vse povezave med rastlinami in glivami je »skupno življenje dveh ali več organizmov« (Brundrett, 2004; Lewis, 1985; Smith in Read, 2008). Definicijo mikorize je postavil Brundrett (2004), ki pravi, da je mikoriza simbiotska povezava, ključna za enega ali oba partnerja, med glivo (specializirano na življenje v tleh in v rastlini) in korenino (ali drugim organom v tleh) žive rastline, ki je primarno odgovorna za prenos hranilnih snovi. Mikoriza se razvije v specializiranem organu rastline, kjer se intimni kontakt razvije v sinhroniziran organ glive in rastline (Brundrett, 2004). Poleg definicije je Brundrett (2004, 2008), ki mikorizo razvršča primarno glede na morfološke kriterije, katere določa gostiteljska rastlina, izpostavil naslednje značilnosti mikoriznih simbioz:

1. Struktura in razvoj glivne hife se spremenita v prisotnosti korenine gostiteljske rastline. Tako imenovana hifa, ki 'se rodi iz korenine', se razlikuje od hife, ki je specializirana za rast v tleh.
2. Vse oblike mikorize razvijejo intimni kontakt med hifo in rastlinsko celico na mestu, kjer prihaja do izmenjave hranilnih snovi.
3. Primarna vloga mikorize je prenos mineralnih in hranilnih snovi od glive do rastline. V večini primerov je prisoten tudi obraten proces, prenos metabolnih snovi od rastline do glive, torej je korist obeh partnerjev uravnotežena ('balanced mycorrhiza').
4. Mikoriza zahteva usklajen razvoj med glivo in rastlino, zato hife v večjem delu kolonizirajo mlade korenine (z izjemo 'izkoriščevalskih' oblik mikorize, npr. miko-heterotrofne rastline z arbuskularno, orhidejsko ali ektomikorizo).

5. Rastline nadzorujejo intenziteto kolonizacije mikoriznih gliv z rastjo korenin, z odpravljanjem starejših hifnih povezav v rastlinskih celicah (arbuskularna in orhidejska mikoriza) ali s spreminjanjem razrasti koreninskega sistema (ektomikorizne glive).
6. Korenine so primarni habitat za mikorizne glive, z izjemo nekaterih oblik mikorize, ki se lahko razvijejo tudi v steblu (nekateri oblike orhidejske mikorize).

Poznamo različne oblike mikorize (Brundrett, 2004; Smith in Read, 2008), ki jih delimo glede na način stika med glivo in rastlino ter specifičnega gostitelja. Brundrett (2004) je oblike mikorize razdelil hierarhično po razredih, v katere je vključil tudi tiste, ki jih drugi avtorji, npr. Smith in Read (2008), obravnavajo kot ločene skupine. Vendar splošno sprejeta razvrstitev mikoriznih gliv v skupine ostaja enaka še od zadnje izdaje avtorjev Smith in Read (2008), zato smo opis povzeli iz diplomskega dela (Štraus, 2010).

Preglednica 1: Hierarhična razdelitev mikoriznih skupin po Smith in Read (2008), z dopolnitvijo subepidermalne mikorize po Brundrett (2004)

	RASTLINSKI PARTNER	GLIVNI PARTNER	LASTNOSTI	NAHAJALIŠČE
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, nekatere 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
erikoidna mikoriza	<i>Ericales</i> , nekateri mahovi	<i>Ascomycota</i> (<i>Hymenoscyphus</i> , <i>Oidiodendron</i>)	klopčiči hif znotraj celic primarne skorje	borealni ekosistemi
orhidejska mikoriza	orhideje	<i>Basidiomycota</i>	značilno se pojavljajo propagule gliv v semenu rastlinskega partnerja in klopčiči hif znotraj celic primarne skorje korenin	/
subepidermalna mikoriza	edini primeri znani pri enokaličnicah iz Avstralije <i>Thysanotus</i> spp.	neznane	hife v prostorih pod celicami povrhnjice	Avstralija

Obstajajo tudi izjeme (posebne oblike mikorize), pri katerih je lahko neenakomerno razvit ali celo nerazvit plašč, ali pa lahko manjka Hartigova mreža (Smith in Read, 2008). Imenovana

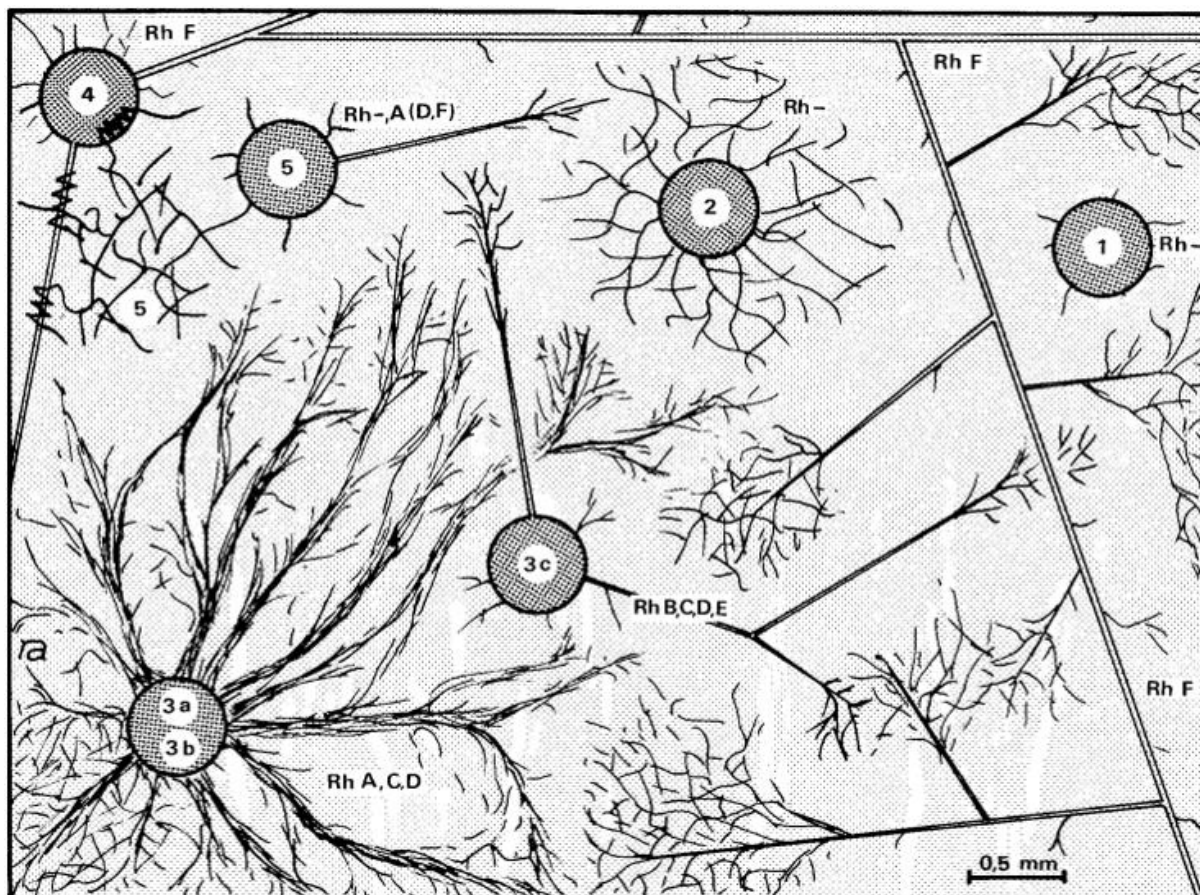
odstopanja kažejo na to, da uvrščanje mikoriznih gliv v skupine po strogih načelih ni vedno mogoče.

Glive, ki tvorijo ektomikorizne povezave, izhajajo iz družin Basidiomycotina (glive iz rodov *Hebeloma*, *Scleroderma*, *Laccaria*, *Russula*...), Ascomycotina (glive iz rodov *Cenococcum*, *Tuber*, *Genea*...) in Glomeromycotina (*Endogone*) (Smith in Read, 2008). Rastlinskih partnerjev, ki tvorijo ektomikorizo, je okrog 3 % vseh znanih taksonov rastlin, med njimi so vrste iz družin *Pinaceae*, ki so razširjene predvsem v borealnih gozdovih na severnem delu in *Fagaceae*, ki so razširjene v severnih in južnih gozdovih zmernega pasu, kot tudi v tropskih delih gozdov jugovzhodne Azije. Delež ektomikoriznih dreves v vlažnih tropskih predelih je zanemarljiv (Smith in Read, 2008). Ektomikorizne glive so v večjem delu generalisti, torej lahko tvorijo mikorizne povezave z različnimi rastlinskimi partnerji (Bruns in sod., 2002; Courty in sod., 2010; Cullings in sod., 2000). Nekatere raziskave (Cullings in sod., 2000; Horton in Bruns, 1998) so predvidevale, da več kot 90 % ECM gliv tvori mikorizo z različnimi rastlinskimi partnerji, vendar so kasnejše raziskave (Courty in sod., 2010; Kennedy in sod., 2003; Kranabetter, 2005) delež znižale na 12-48 %. Prav tako lahko nekatere rastlinske vrste iz rodov *Acacia*, *Casuarina*, *Eucalyptus*, *Populus* in *Quercus*, tvorijo več oblik mikoriznih simbioz hkrati, na primer ektomikorizno in arbuskularno mikorizo (AM) (He in sod., 2003). Večinoma rastlinskega partnerja najprej kolonizira AM gliva, kasneje pa se ji pridruži ali jo nadomesti ECM gliva. Predvidevajo, da to zaporedje naselitve lahko izhaja iz evolucije mikoriznih simbioz, ki predvideva, da se je najprej razvila AM in kasneje ostale oblike mikorize (Courty in sod., 2010; Smith in Read, 2008). Dvojno kolonizacijo rastlin verjetno omogočajo povezave med AM in ECM glivami. Fiziološke in ekološke posledice teh povezav pa ostajajo še nepojasnjene (Selosse in sod., 2006).

2.2 EKSPLOKACIJSKI TIPI (ET) KOT FUNKCIONALNE ENOTE EKTOMIKORIZNIH GLIV

Poleg določanja števila ektomikoriznih tipov in morfotipov, ki dajejo uporabne informacije pri raziskavah biomase korenin, dolžini korenin in volumnu tal, se je kmalu pojavila potreba po definiciji, ki bi klasificirala razvoj in diferenciacijo zunaj koreninskega micelija, ki ima ključno vlogo pri ekološki klasifikaciji ektomikorize. S tem namenom je Agerer (2001) opisal pet različnih funkcionalnih skupin ali tako imenovanih eksploracijskih tipov (ET), ki temeljijo

na pojavljanju in razrasti izhajajočih hif oziroma na prisotnosti in diferenciaciji rizomorfov in so tesno povezani z ekološko vlogo ektomikoriznih gliv v naravi (Slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz eksploracijskih tipov (ET) s prečnim prerezom ektomikorize in zunaj koreninskega micelija (Agerer, 2001: 108). 1: kontaktni ET, 2: ET na kratke razdalje, 3a, b: ET na srednje razdalje, resasti podtip in pregrinjalni podtip, 3c: ET na srednje razdalje, gladek podtip, 4: ET na dolge razdalje, 5: pick-a-back eksploracijski tip; Rh: rizomorfi razviti, Rh-:rizomorfi niso razviti, A-F: tipi rizomorfov po Agerer (1987-2008).

2.2.1 Kontaktni eksploracijski tip

Kontaktni eksploracijski tip predstavljajo ektomikorizne glive z gladkim ektomikoriznim plaščem in z redkimi izhajajočimi hifami (Slika 1). Ektomikorizni vršički so pogosto v tesnem kontaktu z okoliškim substratom. Predstavniki gliv te skupine pripadajo rodovom *Balsamia*, *Chroogomphus*, *Lactarius*, *Leucangium*, *Russula*, *Tomentella* in *Tuber* s kratkimi cistidiji (Agerer, 1987-2008, 2001).

2.2.2 Eksploracijski tip na kratke razdalje

V to skupino uvrščamo ektomikorizne glive s prisotnimi hifami, ki gosto obdajajo mikorizni vršček. Rizomorfi niso razviti (Slika 1). Predstavniki ET na kratke razdalje iz skupine askomicetnih gliv so *Cenococcum*, kot najbolj uveljavljen v tej skupini, *Elaphomyces*, *Genea*, *Humaria*, *Sphaerosporella*, *Sphaerozone*, *Tricharina* in *Tuber* z dolgimi cistidiji. Poleg askomicetnih gliv, se v to skupino uvrščajo tudi bazidiomicetne ektomikorizne glive, kot so *Byssocorticium*, *Descolea*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Rozites*, *Tomentella* in *Tylospora* (Agerer, 1987-2008, 2001).

2.2.3 Eksploracijski tip na srednje razdalje

Ektomikorizne glive, ki se uvrščajo v to skupino, tvorijo rizomorfe in glede na lastnosti rizomorfov ločimo tri pod tipe: resasti, pregrinjalni in gladek podtip (Slika 1).

Resasti (fringe) podtip

Pri omenjenem podtipu mikorizne glive tvorijo pahljačaste razvejitve hif in rizomorfov, ki se ponavljajoče povezujejo, kot 'franže' ali rese na preprogi. Na površini rizomorfov lasasto izraščajo hife, ki tvorijo povezave z okoliškim substratom (Agerer, 2001). Rizomorfi so organizirani v tip A (Agerer, 1987-2008) in izjemoma v tip C in D (Agerer, 1987-2008). V to skupino se uvrščajo ektomikorizne glive iz rodov *Amphinema*, *Dermocybe*, *Cortinarius*, *Entoloma*, *Laccaria*, *Lyophyllum*, *Piloderma* in *Tricholoma* (Agerer, 1987-2008, 2001).

Pregrinjalni (mat) podtip

Ektomikorizne glive, ki razvijejo pregrinjalni podtip eksploracijskih tipov, imajo omejen obseg razraščanja, saj so njihovi rizomorfi nediferencirani ali le deloma diferencirani tipi A, C in izjemoma D (Agerer, 1987-2008, 2001). Rodovi, ki tvorijo pregrinjalni podtip ET, so *Bankera*, *Boletopsis*, *Geastrum*, *Gomphus*, *Hydnellum*, *Hysterangium*, *Phellodon*, *Piloderma*, *Ramaria* in *Sarcodon* (Agerer, 1987-2008).

Gladek podtip

Rizomorfi ektomikoriznih gliv so znotraj nediferencirani, deloma diferencirani ali zelo redko razvijejo osrednje jedro s tankimi hifami. Ektomikorizni plašč je gladek, večinoma brez izhajajočih hif ali z le redkimi posameznimi hifami (Agerer, 2001). Rizomorfi se uvrščajo v skupino B, C in D, zelo redko lahko zasledimo tip E (Agerer, 1987-2008). Ektomikorizne glive, ki tvorijo gladek podtip, pripadajo rodovom *Albatrellus*, *Amanita*, *Gomphidius*, *Lactarius*, *Polyporoletus*, *Thaxterogaster*, *Telephora*, *Tomentella* in *Tricholoma* (Agerer, 1987-2008).

2.2.4 Eksploracijski tip na dolge razdalje

Eksploracijski tip na dolge razdalje predstavlja ektomikorizne glive z gladkim plaščem in redkimi vendar zelo visoko razvitimi – diferenciranimi rizomorfi tipa F (Agerer, 1987-2008; Agerer, 2001). Omenjeni rizomorfi se lahko v substratu razraščajo več decimetrov daleč (Slika 1). Predstavniki te skupine so ektomikorizne glive iz rodov *Boletinus*, *Boletus*, *Chamonixia*, *Gyrodon*, *Gyroporus*, *Leccinum*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Tylopilus* in *Xerocomus* (Agerer, 1987-2008).

2.2.5 Pick-a-back eksploracijski tip

Ta tip tvorijo predvsem predstavniki iz družine *Gomphidiaceae*. Čeprav vrste iz rodov *Gomphidius* in *Chroogomphus* tvorijo navadno ektomikorizo, se lahko razraščajo znotraj rizomorfov in/ali plašča ektomikoriznih gliv *Suillus* sp. in *Rhizopogon* sp. Postanejo lahko ektendomikorizne, pogosto tvorijo haustorije v celicah primarne skorje korenin v povezavi z njihovo ektomikorizo. Sicer razvijejo kontaktni eksploracijski tip ali gladek podtip eksploracijskega tipa na srednje razdalje (Agerer, 2001) (Slika 1).

Z oblikovanjem različnih eksploracijskih tipov ektomikorizne glive: (1) omogočajo rastlinam doseganje različnega volumna tal in spremenjeno dostopnost vode in hranil; predstavljajo korist za rastline, ki se s pomočjo zunaj koreninskega micelija gliv razraščajo v substrat in dosegaajo območja bogata s hranilnimi snovmi in vodo, ki jih glive transportirajo do korenin; (2) rastline presežke ogljikovih hidratov, ki nastajajo kot produkt metabolnih procesov

investirajo v glivnega partnerja (Agerer, 2001; Hobbie, 2006; Weigt in sod., 2012). Z razraščanjem zunaj koreninskega micelija ektomikorizne glive močno povečajo površino v tleh, oz. volumen tal, iz katerega rastline pridobivajo vodo in hranilne snovi (Smith in Read, 2008). Razvoj eksploracijskih tipov je vrstno specifičen. Z razvojem izhajajočih elementov omogočajo vsi eksploracijski tipi širši kontakt s substratom, čeprav imamo na eni strani kontaktni tip, kjer so hife koncentrirane na površini plašča, ki z veliko površino prihaja v stik s substratom in na drugi strani eksploracijski tip na dolge razdalje, ki na površini plašča nima izhajajočih hif, se pa z diferenciranimi rizomorfi razrašča v substrat na zelo dolgih razdaljah – izven dosega korenine (Agerer, 2001).

Predstave o razvoju sistemov vzpostavitve in delovanja eksploracijskih tipov so kompleksne. Peay in sod. (2011) so postavili model kolonizacije korenin z mikoriznimi glivami, ki temelji na časovnih spremembah v gostoti korenin. V prvi fazi, so korenine mladih rastlin (v odsotnosti starih dreves oziroma sestoja) večinoma nekolonizirane z mikoriznimi glivami, zato poteka sodelovanje med sporami gliv, ki temelji na količini spor in njihovi odzivnosti. V srednji fazi, ko je gostota korenin že večja in imajo korenine deloma že razvito mikorizo, temelji kolonizacija novih nemikoriznih korenin predvsem na eksploracijskih tipih na dolge razdalje, ki lahko v substratu poiščejo nove korenine. V zadnji, zreli fazi kolonizacije, imajo drevesa v sestoju zelo razvite korenine, katerih gostota je velika, zato v tem modelu kolonizacija temelji na eksploracijskih tipih na kratke razdalje. Mikorizne korenine z eksploracijskimi tipi na kratke razdalje v osrednjem delu koreninskega sistema so v tesnem stiku z novimi, nemikoriznimi koreninami in tako lahko vzpostavijo nov stik, medtem ko mikorizne korenine z eksploracijskimi tipi na dolge razdalje prevladujejo na robovih koreninskega sistema in iščejo nova mesta za kolonizacijo s pomočjo zunaj koreninskega micelija.

Weigt in sod. (2012) je na osnovi analize slik in izračunov indeksov na osnovi eksploracijskih tipov kvantificirala površino, na kateri se razrašča zunaj koreninski micelij in njegovo biomaso v substratu. Poleg metode, ki temelji na ET, so v svetu razvite tudi metoda z micelijskimi vrstnimi žepki (Wallander in sod., 2013; Wallander in sod., 2001), vrstnimi mrežicami ali cilindri (*angl. ingrowth soil cores*) (Hedh in sod., 2008; Hendricks in sod., 2006; Majdi in sod., 2008), metoda z rizotroni in minirizortoni (Pritchard in sod., 2008;

Rygiewicz in sod., 1997) in biokemijske metode (hitin, ergosterol in fosfolipidne maščobne kisline) (Ekblad in sod., 1998).

2.3 FUNKCIJE EKTOMIKORIZNIH GLIV

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 razdelkov v tleh. Micelij z razraščanjem v tleh zaseda večji volumen tal, ter hkrati povečuje površino absorpcijskih organov (Kraigher, 1996). 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).

Iz fiziološkega vidika so ektomikorizne glive in zunaj koreninski micelij pomembni, ker omogočajo privzem različnih snovi iz substrata. Ektomikorizne glive proizvajajo številne zunajcelične in na celično steno vezane hidrolitične in oksidacijske encime, ki razgrajujejo organske snovi v tleh (*angl. soil organic matter – SOM*) in na ta način sproščajo v substrat komponente fosforja (P) (Baghel in sod., 2009; Cairney, 2011; Plassard in Dell, 2010) in dušika (N) (Lindahl in sod., 2007; Lindahl in Taylor, 2004), katere lahko sprejemajo v micelij. Fosfor pridobivajo iz kompleksnih molekul kot so inozitol fosfat, nukleotidi ali fosfolipidi (Criquet in sod., 2004). Fosfataze so encimi, ki omogočajo razgrajevanje kompleksnih molekul. Med njimi so tudi fosfomonoesteraze, ki jih najdemo tudi pri ektomikoriznih glivah (Alvarez in sod., 2006; Alvarez in sod., 2004; Alvarez in sod., 2005; Alvarez in sod., 2012; Baghel in sod., 2009). Viri dušika v tleh so organske komponente humusa, rastlinskega opada ali odmrlih mikrobnih celic, različne oblike enostavnih aminokislin, aminosladkorjev, nukleotidov in kompleksne oblike, kot so hitin, polipeptidi in polifenoli (Lindahl in Taylor, 2004). Encimi ektomikoriznih gliv, ki razgrajujejo dušikove komponente so zunajcelične proteaze (Nygren in sod., 2007). Ektomikorizne glive lahko privzemajo tudi anorganske ione (PO_4^{3-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , K^+) z raztapljanjem mineralnih delcev v tleh, kot so apatit, ki vsebuje fosfor (Hedh in sod., 2008; Wallander in sod., 2002), ortoklaz, sljuda in amfibol, ki vsebujejo Ca, Mg in K, medtem ko železove ione najdemo v sljudi in železovih oksidih (Finlay in sod., 2009; Landeweert in sod., 2001). Poleg

pridobivanja hranilnih snovi lahko mikorizne glive selektivno sprejemajo toksične ione težkih kovin (Al Sayegh-Petkovšek in Pokorny, 2006; Al Sayegh Petkovšek in sod., 2002), imobilizirajo delovanje patogenih organizmov v plašču (Parádi in Baar, 2006) in izločajo antibiotike v mikorizosfero s pomočjo posebnih struktur imenovanih sideroforji (Kraigher, 1996).

Ektomikorizne glive in predvsem zunaj koreninski micelij (*angl. extramatrical mycelium* – EMM) imajo ključno vlogo pri ekoloških procesih, kot so privzem hranil iz tal (Harley, 1989), kroženje dušika (N) (Deckmyn in sod., 2014; Hodge in Fitter, 2010), kroženje ogljika (C) (Deckmyn in sod., 2014; Simard in sod., 1997), mineralno preperevanje (Landeweert in sod., 2001), tvorba talne organske snovi (*angl. soil organic matter* - SOM) (Ekblad in sod., 2013), ukoreninjanje in preživetje sadik (Smith in Read, 2008) in spreminjanje sestave koreninskih združb (Van Der Heijden in sod., 1998). Ocene količin ogljika v gozdnih tleh se gibljejo med 25 % in 63 % bruto primarne produkcije glede na globalni nivo (Litton in sod., 2007) in lahko imajo velik vpliv na fizikalne, kemične in biološke lastnosti tal. Približno 60 % neto primarne produkcije ogljika je v ektomikoriznih glivah in zunaj koreninskem miceliju (Ekblad in sod., 2013). Razporeditev talnega ogljika povezuje dogajanje v krošnjah dreves z aktivnostmi, ki potekajo v gozdnih tleh in zagotavlja tok organskega ogljika od poganjkov do tal preko drobnih korenin in mikoriznih hif (Wallander in sod., 2013). Pot, po kateri organski ogljik vstopa v tla, je kompleksna, poleg tega se velik delež ogljika izgubi z dihanjem, manjši delež pa se veže v talno organsko snov (*angl. Soil organic matter* – SOM) (Janssens in sod., 2001). Za raziskovalce je raziskovanje EMM bazenov v tleh in vstopanje biomase vanje, ne da bi pri tem zajeli tudi drobne korenine in mikorizo, velik izziv. Poleg tega so nekateri raziskovalci (Wallander in sod., 2004) mnenja, da je potrebno vnos biomase v EMM bazene s pomočjo drobnih korenin in mikorize obravnavati na enakem nivoju in ne ločeno za koreninski, mikorizni in EMM del.

2.4 VPLIV PODNEBNIH DEJAVNIKOV NA PODZEMNI IN NADZEMNI DEL BUKVE

Bukev (*Fagus sylvatica* L.) je široko razširjena vrsta v centralnem in zahodnem delu Evrope. V severnih predelih se razrašča v nižjih nadmorskih višinah, medtem ko v južnem delu Evrope raste na nadmorski višini nad 1000 m (Von Wühlisch, 2008). Razširjenost bukke je

omejena s podnebnimi dejavniki, ki so povezani s fiziološkimi odzivi vrst (Bradshaw in sod., 2010; Huntley in sod., 1989). Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na razširjenost bukve je povišana temperatura zraka med rastno sezono, poleg tega imajo vpliv tudi minimalne zimske temperature in količina padavin (Fang in Lechowicz, 2006). Temperature, ki omejujejo razširjenost bukve v severnih in južnih predelih Evrope, so predstavljene v Preglednica 2.

Preglednica 2: Temperature, ki omejujejo razširjenost bukve v severnih in južnih predelih Evrope (Fang in Lechowicz, 2006).

	Povprečna letna temperatura (°C)	Povprečna temperatura najhladnejšega meseca (°C)	Povprečna temperatura najtoplejšega meseca (°C)
Jug	13.5	4.7	23
Sever	6.6	-2.7	16.9

Optimalne temperature za rast bukve so opredeljene s povprečno januarsko temperaturo (-1 °C) in povprečno julijsko temperaturo (18 °C) (Huntley in sod., 1989). Rast bukve je negativno korelirana z maksimalnimi temperaturami v juniju in juliju (Michelot in sod., 2012). Bukev se težko prilagaja na novodobne podnebne spremembe (Huntley in sod., 1989), zato lahko hitre spremembe v prihodnosti, ki jih napovedujejo znanstveniki, povzročijo močan selekcijski pritisk na to vrsto (Kramer in sod., 2010). Temperature ozračja v Evropi naj bi se po nekaterih napovedih med leti 2021 – 2050 dvignila za 1,0 do 2,5 °C, med leti 2071 – 2100 pa za 2,5 do 4,0 °C. Najvišji dvig temperature pričakujejo v zimskem času v vzhodni in severni Evropi, in v južnih predelih Evrope v poletnem času (Eea, 2007). Skupaj s povišanimi temperaturami se bodo povečale tudi koncentracije atmosferskega CO₂ v obsegu med 730 – 1020 ppm do leta 2100 (Meehl in sod., 2007).

Bukovi gozdovi predstavljajo 7,3% gozdne površine evropskih gozdov (Barbati in sod., 2011; Eea, 2007). Poleg tega predstavljajo največje gozdne zaloge izmed vseh tipov gozdov v Evropi, več kot 370 m³ ha⁻¹, in shranjujejo velike količine odmrlega lesa (več kot 51 m³ ha⁻¹ v goratih predelih bukovih gozdov) (Barbati in sod., 2011). Povprečna biomasa drobnih korenin znaša med 0,39 ± 0,21 kg m⁻² (Finér in sod., 2007). Količine organskega ogljika v tleh na območjih bukovih gozdov v centralni Nemčiji znašajo med 11 in 22 kg m⁻² na globini -20 cm in 13 do 30 kg m⁻² na globini do 100 cm (Meier in Leuschner, 2010).

Številne raziskave predstavljajo vpliv sprememb v povezavi s količino padavin ali sušo in posledicami povečanih temperatur na rast bukve (Geßler in sod., 2007; Meier in Leuschner,

2008; Meier in Leuschner, 2010; Michelot in sod., 2012; Rose in sod., 2009), kljub temu pa primanjkuje raziskav na področju vpliva povišanih temperatur v tleh. Zimske temperature tal v zmernih gozdovih na globini 5 do 20 cm znašajo 1 do 4 °C (Mainiero in sod., 2010; Tingey in sod., 2005), v poletnem času pa narastejo na 15 °C (Ostonen in sod., 2005). Temperatura lahko vpliva na tok ogljika in njegovo asimilacijo (Meier in Leuschner, 2010; Overdieck in sod., 2007). Znižanje temperatur za 15 °C do 10 °C povečajo izgubo ogljika iz korenin pšenice v rizosfero (Brimecombe in sod. 2007). Neugodne temperature lahko povzročijo uhajanje ionov in metabolitov iz korenin v substrat, kar lahko neposredno vpliva na kroženje ogljika v celotni rastlini in povzroči negativni vodni potencial listov, nepopolno zapiranje listnih rež in posledično znižanje neto asimilacije CO₂ (Brimecombe in sod. 2007). Spremembe temperature lahko vplivajo na metabolizem celic vključno s celično delitvijo, sintezo proteinov, dihanjem in translokacijo ionov (Brimecombe in sod. 2007). Majhne spremembe v biomasi drobnih korenin, morfologiji ali mikorizni simbiozi, ki nastanejo zaradi okoljskih sprememb, lahko povzročijo velike spremembe pri kroženju ogljika, hranil ali vode v gozdovih (Ostonen in sod., 2011).

Rast drobnih korenin je pozitivno korelirana z visokimi temperaturami tal ob predpostavki, da sta vlaga tal in dostopnost hranil ustrezni (Pregitzer in sod., 2000). Temperatura tal ne vpliva le na rast korenin, temveč tudi na nadzemni del rastlin, oziroma na fotosintezo in dihanje (Lyr in Garbe, 1995; Pregitzer in sod., 2000). Enakomerna rast med nadzemnim in podzemnim delom rastlin je uravnavana z notranjim hormonalnim nadzorom pri rastlinah (Hoch, 2011). Segrevanje je do določene meje lahko koristno za drevesa borealnih območij in območij visokih nadmorskih višin (Hoch, 2011; Lahti in sod., 2005; Way in Oren, 2010), na območjih z visokimi temperaturami pa je lahko učinek nasproten (Wertin in sod., 2011). Odziv na povišane temperature je bolj opazen pri listavcih kot pri iglavcih in se izraža s povečano višino poganjkov, premerom stebela in skupno biomaso. Prav tako se povečata teža in površina listov kot tudi število listov (Way in Oren, 2010). Medtem ko so nekateri avtorji ugotovili, da se teža korenin ne spreminja pri povišani temperaturi (Way in Oren, 2010), so drugi dokazali zmanjšanje drobnih korenin (Bronson in sod., 2008), biomase in nekromase korenin pod vplivom segrevanja tal (Zhou in sod., 2011) ali povečanje mase korenin (Peng in Dang, 2003). Optimalna temperatura za rast rastlin v eksperimentalnih razmerah je 20 °C (Lyr in Garbe, 1995). Overdieck in sod. (2007) so ugotovili, da se sadike bukve na povišane temperature zraka odzovejo z večjim premerom stebela, s povečanim razmerjem med listno

površino in skupno biomaso in z zmanjšanim razmerjem listne mase in listne površine (*angl. leaf area ratio – LAR*), medtem ko razmerje med koreninami in poganjki ostaja nespremenjeno.

2.5 VPLIV OKOLJSKIH SPREMEMB NA EKTOMIKORIZO

Poleg tega, da spremembe temperature vplivajo na rast bukve, vplivajo tudi na simbiotskega partnerja, tj. mikorizne glive v tleh. Courty in sod. (2010) so opredelili tri kategorije podnebnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na ektomikorizne glive: (1) direkten vpliv na gostiteljsko rastlino (povečane koncentracije CO₂ v zraku, segrevanje ozračja), (2) indirektni vpliv na glivnega simbionta zaradi sprememb v razporejanju ogljika v gostiteljski rastlini (fotosinteza) in (3) direkten vpliv na glivnega simbionta (segrevanje, dostopnost vode). V večini primerov naštetih dejavniki delujejo skupaj, zato je težko definirati posamezne vplive.

Največkrat omenjena posledica globalnih klimatskih sprememb je povišana temperatura v ozračju, ki vpliva na rastline in posledično tudi na življenje pod površjem. Segrevanje ozračja vpliva na fenologijo dreves in podaljšuje rastno sezono (Courty in sod., 2010) poleg tega pa ima vpliv tudi na rast in respiracijo mikrobov v tleh (Ekblad in sod., 2013). Spremembe temperature različno vplivajo na ektomikorizne glive, vendar je v večini primerov vpliv temperature v tleh povezan s spremembami na gostiteljski rastlini oziroma z dostopnostjo ogljikovih hidratov (Heinemeyer in sod., 2007). Povišane koncentracije ogljika v rastlini omogočajo večje koncentracije ogljika pri ektomikoriznih glivah. V primeru pomanjkanja dušika in fosforja v tleh in v primeru suše, je inducirana rast korenin v tleh in vzporedno rastline investirajo več ogljika v mikorizne glive, kadar pa so absolutne vrednosti ogljika pri rastlini nizke, je zmanjšana tudi rast mikoriznih gliv (Deckmyn in sod., 2014). Deckmyn in sod. (2014) poudarjajo, da je poleg povišane temperature potrebno upoštevati tudi spremembe v svetlobi, ki prav tako vplivajo na koncentracije ogljika. Nizka svetloba, kot tudi nizke temperature, znižujejo koncentracije ogljika v rastlini in posledično tudi pri glivah. Kljub temu pa se vnos ogljika iz rastline v glive povečuje, če le-te nemoteno oskrbujejo rastlino s hranilnimi snovmi (Lehto in Zwiazek, 2011). Na povišane temperature v tleh je dobro prilagojena ektomikorizna gliva *Cenococcum geophilum* (Lobuglio in sod., 2002), ki je tudi sicer široko razširjena vrsta v gozdnih ekosistemi. Herzog in sod. (2013) so na sadikah hrasta dokazali povečano prisotnost ektomikorizne glive *C. geophilum* pri povišani temperaturi in

zmanjšano pri suši, medtem ko v kombinaciji obeh dejavnikov niso opazili sprememb v primerjavi s kontrolnim poskusom. Poleg tega so opazili povečano encimsko aktivnost ektomikorizne glive v kombinaciji obeh dejavnikov, medtem ko je bila aktivnost v sušnem poskusu in pri povišani temperaturi zraka zmanjšana.

Suša je lahko posledica povišane temperature ali pomanjkanja vode v tleh. Povečan delež mikoriznih gliv v sušnih razmerah sta raziskovala Vargas in Allen (2008), ki sta ugotovila, da za rizomorfe velja negativna korelacija v povezavi s sušo. Poleg tega se dolžina rizomorfov hitreje spreminja kot dolžina drobnih korenin v tleh. Mikorizne glive zmanjšujejo vpliv suše na rastlino s povečano rastjo zunaj koreninskega micelija v substratu, poleg tega ščitijo koreninske vršičke z ektomikoriznim plaščem, ki obdaja površino (Di Pietro in sod., 2007). Poleg korenin tudi mikorizne glive in zunaj koreninski micelij prispevajo k hidravličnemu dvigu vode v tleh (Pritchard in sod., 2008a; Smith in Read, 2008). Drevesa se na pomanjkanje vode v tleh odzovejo z zapiranjem listnih rež in zmanjšano asimilacijo CO₂, kar pomeni zmanjšan vnos ogljika v ektomikorizne glive. To lahko povzroči prezgodnje odmiranje korenin in ektomikoriznih gliv oziroma spremembo ektomikorizne združbe gliv v gozdnih tleh (Courty in sod., 2010).

Vpliv povišanih koncentracij CO₂ se izraža pri mikoriznih glivah posredno preko rastlinskega partnerja (Courty in sod., 2010; Deckmyn in sod., 2014; Ekblad in sod., 2013). Povečane koncentracije CO₂ pomenijo več fotosinteze in več ogljika, ki ga rastline transportirajo v mikorizne glive in posledično večjo rast mikoriznih gliv v substratu (Finzi in sod., 2007). Povišane koncentracije CO₂ povečajo umrljivost drobnih korenin v primerjavi z njihovo produkcijo, kar je povezano s krajšo življenjsko dobo drobnih korenin v tleh (Pritchard in sod., 2008a). Weigt in sod. (2011) so opazili majhno povečanje dolžine zunaj koreninskega micelija pri smreki, ki je bila izpostavljena povečani koncentraciji CO₂. Opazili so spremembe pri razvoju različnih eksploracijskih tipov zunaj koreninskega micelija, kar pojasnjujejo s povečano koncentracijo ogljika v tleh kot posledico povečane koncentracije CO₂ v zraku.

2.6 BIODIVERZITETA EKTOMIKORIZNIH GLIV V GOZDNIH EKOSISTEMIH

Ektomikorizne glive so v naravi ključne za rast in vitalnost gozdnega drevja. Drevesa oskrbujejo s hranilnimi snovmi, ki so v tleh slabo mobilna oziroma so prisotna v limitnih vrednostih, kot na primer fosfor, dušik ali mikrohranila (Smith in Read, 2008). Vse to poteka vzajemno z rastlinskim partnerjem, ki mikoriznim glivam v zameno za hranila vrača viške ogljikovih hidratov, ki nastanejo pri fotosintezi (Courty in sod., 2010). Poleg mikoriznih gliv so v tleh še številni drugi mikroorganizmi, ki vzdržujejo mikorizosfero v ravnovesju (Frey-Klett in sod., 2007).

Z raziskavami združb ektomikoriznih gliv v gozdnih tleh so se vzporedno razvijale tudi metode identifikacije. Sprva je identifikacija potekala na osnovi anatomsko-morfološke identifikacije, ki jo je postavil Agerer (1987-2008) in temelji na primerjavi lastnosti ektomikorizne korenine, glivnega plašča in Hartigove mreže z že znanimi opisi iz literature. Klasifikacija predvideva standardizirano fotografiranje novega tipa, opis morfoloških lastnosti tipa ektomikorize (tip razraščanja mikorize, značilnosti površine plašča, barva, izmere...), analizo 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 (Agerer, 1987-2008). Le redko pa z uporabo te metode določimo glivnega partnerja do vrste (Courty in sod., 2010; Kraigher, 1996; Štraus in sod., 2011), saj za številne vrste, ki domnevno tvorijo ektomikorizo, še ni ustreznih opisov.

Sledile so molekulske tehnike, ki temeljijo na pomnoževanju ITS odseka ribosomske DNA (Gardes in Bruns, 1993). Metoda, imenovana verižna reakcija s polimerazo (PCR), je danes splošno razširjena in uporabna na različnih področjih. Ektomikorizne glive identificiramo s pomnoževanjem ITS regije ribosomske DNA, sledi ekstrakcija DNA genov za posamezni tip mikorize, pomnoževanje osamljenega gena, sekvenciranje in primerjava sekvence s sekvencami v spletnih bazah NCBI (National center ... , 2014) in UNITE (Köljalg in sod., 2013).

Po primerjavi sekvenc s sekvencami iz spletnih baz lahko nadaljujemo s filogenetskimi analizami (Cavalli-Sforza in Edwards, 1967; Hillis in Bull, 1993). Najprej pripravimo izbor sekvenc iz spletnih baz, sledi poravnava sekvenc z različnimi programi kot so na primer

MAFFT (Kato in Standley, 2013) ali MEGA (Tamura in sod., 2013). Sledi izbira najbolj optimalnega modela nukleotidnih substitucij in izdelava filogenetskih dreves. Dandanes pa obstaja širok nabor metod, s katerimi lahko preučujemo pestrost organizmov v tleh. Med najbolj sodobnimi so mikrobní taksonomski mikrotesti (*angl. phylochips*), metagenomika in mikrosateliti za ugotavljanje populacijske genetike (Courty in sod., 2010).

2.7 METABOLNA AKTIVNOST MIKORIZNIH GLIV

2.7.1 Encimska aktivnost mikoriznih gliv

Encimska aktivnost ektomikoriznih gliv in njihovega zunaj koreninskega micelija ima pomembno vlogo pri prenosu hranil iz gozdnih tal in listnega opada do rastline. Encimi, ki jih glive sproščajo v okolico, omogočajo razgradnjo snovi, ki so vezana v tleh in rastlinam nedostopna (Kjøller in Struwe, 2002). V gozdnih ekosistemih imajo glive ključno vlogo pri obratu, preperevanju in mineralizaciji ogljika, dušika, fosforja in drugih snovi, ki jih pretvorijo v obliko, ki je zopet dostopna rastlinam in drugi talni mikroflori (Ekblad in sod., 2013; Wallander in sod., 2013).

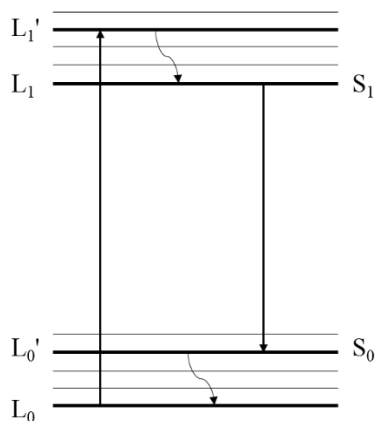
Za opazovanje encimske aktivnosti lahko izbiramo med nedestruktivnimi ali destruktivnimi metodami. Nedestruktivne metode temeljijo na opazovanju encimske aktivnosti pri živih celicah. Navadno te metode ne vključujejo barvanja, za opazovanje pa izberemo svetlobni mikroskop (arbuskularna mikoriza), epifluorescenčni mikroskop (avtofluorescenca) (Vierheilig in sod., 2005) ali konfokalni laserski mikroskop (Schweiger in sod., 2002). Destruktivne metode zajemajo dva tipa barvanj: vitalna barvanja, kjer opazovanje aktivnosti encimov temelji na metabolično aktivnem tkivu gliv, in nevitalna barvanja, kjer tehnike barvanja obarvajo tako živo kot mrtvo tkivo (Vierheilig in sod., 2005). Nedestruktivne metode so navadno bolj v uporabi pri arbuskularni mikorizi, kjer so korenine neobarvane in ni potrebno predhodno razbarvanje, medtem ko je primarna skorja in plašč ektomikoriznih korenin naravno obarvan, kar zahteva predhodno razbarvanje korenin (Vierheilig in sod., 2005). Pritsch in sod. (2011; 2004) so razvili avtomatizirano metodo z mikroploščami, ki omogoča merjenje encimske aktivnosti fosfataze, hitinaze in β -glukozidaze s spektrofotometrom (oz. čitalcem ploščic).

V nalogi smo s pomočjo dvofotonskega konfokalnega laserskega mikroskopa LSM 7MP preučevali aktivnost na površino vezane fosfomonoesteraze (*angl. surface.bound phosphatase* – SBP) pri različnih eksploracijskih tipih in različnih temperaturah, ki so jim bile mikorizne sadike izpostavljene. Fosfomonoesteraze so encimi, ki razgrajujejo različne substrate v tleh, kot so inozitol fosfat, polifosfati, mononukleotidi in fosforilirani sladkorji. Glede na pH optimum fosfomonoesteraz ločimo kisle in alkalne fosfataze (Criquet in sod., 2004). Aktivnost kisle fosfataze, ki smo jo preučevali, temelji na hidrolizi p-nitrofenil fosfata (pNPP) v p-nitrofenol fosfat (pNP) in fosfat (P) (Alvarez in sod., 2004). Ko je anorganski ali organski fosfat enkrat privzet iz tal v mikorizne hife, se tam skladišči v obliki polifosfatov (*angl. polyphosphate-P; Poly-P*), ki se kasneje transportirajo do ektomikoriznega plašča in Hartigove mreže (Cairney, 2011). Prehod polifosfatov po tkivu poteka s pomočjo gibljivih tubularnih vakuol ali s pomočjo apoplastnega gibanja po hifah (Cairney, 2011). Kadar količine fosforja v tleh postanejo omejujoče, se v ektomikoriznem tkivu sprožijo procesi razgradnje akumuliranih polifosfatov in transport do rastline, ki poteka na območjih med Hartigovo mrežo in epidermalnimi ali kortikalnimi celicami korenin (Cairney, 2011). Fosfatazna aktivnost tako poteka na plazmalemi celične stene gliv ali rastlin, v hifah, vakuolah in citoplazmi (Cairney, 2011).

Na fosfatazno aktivnost vplivajo biotski (število bakterij in gliv, koncentracija proteinov, anorganski fosfati) (Criquet in sod., 2004) in abiotski faktorji (pH, temperatura, vlaga) (Alvarez in sod., 2006; Alvarez in sod., 2004; Alvarez in sod., 2005; Baghel in sod., 2009; Criquet in sod., 2004). Vpliv pH na aktivnost fosfataze je vrstno specifičen (Alvarez in sod., 2004; Baghel in sod., 2009). Baghel in sod. (2009) so pri glivi *Cantharellus tropicalis* dokazali višjo aktivnost SBP pri 40 °C in značilno nižjo aktivnost pri 35 °C. Korelacijo med kislom fosfatazo in temperaturo ter vlago so opazili tudi Criquet in sod. (2004) v listnem opadu. Alvarez in sod. (2012) so preučevali vpliv morfotipov (*Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum*, *Descolea antarctica*) in vnosov hranilnih snovi (*angl. soil fertility*) v tla na aktivnost kisle fosfataze. Ugotovili so, da na prostorsko razporeditev kisle fosfataze v mikoriznem tkivu vpliva morfotip (zunaj koreninski micelij, mikorizni plašč in Hartigova mreža), medtem ko vnos snovi v tla (*angl. soil fertility*) vpliva na encimsko aktivnost zunaj koreninskega micelija in Hartigove mreže.

2.7.2 Uporaba dvofotonskega konfokalnega mikroskopa za opazovanje encimske aktivnosti

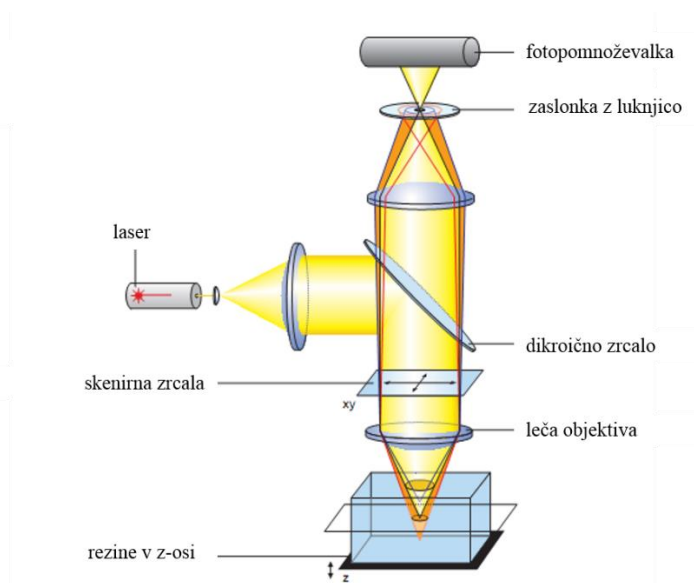
Danes je za proučevanje celic, celičnih struktur in procesov, ki potekajo v njih, zelo razširjena uporaba fluorescenčne mikroskopije. Za razliko od elektronske mikroskopije (Stempak in Ward, 1964), ki je sicer tudi zelo razširjena metoda, omogoča fluorescenčna mikroskopija opazovanje živih celic in procesov, ki potekajo v njih (Heintzmann in Ficz, 2006; Lippincott-Schwartz in Patterson, 2003). Fluorescenca je pojav, pri katerem lahko s svetlobo primerne valovne dolžine molekulo vzbudimo v višje energetske stanje, nato pa vzbujena molekula izseva foton in preide nazaj v osnovno energetske stanje (Hell in Wichmann, 1994). Osnovno (S_0) in vzbujeno (S_1) stanje sta razpršeni zaradi različnih vibracijskih energetske stanj (L_0 , L_0' , L_1 , L_1'). Ko molekulo obsevamo s svetlobo primerne valovne dolžine, ta absorbira foton, elektron pa preide iz osnovnega S_0L_0 v vzbujeno stanje S_1L_1' . Pri prehodu v osnovno stanje se del absorbirane energije pretvori v vibracijsko energijo molekule (S_1L_1), zaradi česar je energija emitiranega elektrona pri prehodu v osnovno stanje S_0L_0' manjša, s tem pa je valovna dolžina emitiranega valovanja daljša od tiste, ki jo je snov absorbirala (Slika 2) (Hell in Wichmann, 1994).



Slika 2: Energijska stanja elektronov (Hell in Wichmann, 1994: 780).

Vibracijska stanja molekul so zvezna, zato svetloba ni monokromatska (Hell in Wichmann, 1994). Fluorescenčni mikroskop ima vgrajen poseben optični element, imenovan dikroično zrcalo, ki odbija svetlobo kratkih valovnih dolžin in prepušča svetlobo dolgih valovnih dolžin. To omogoča opazovanje fotonov, ki jih sevajo vzbujene molekule iz vzorca, medtem ko nas svetloba, s katero osvetljujemo vzorec, pri tem ne ovira (Hell in Wichmann, 1994).

Osnova konfokalnega mikroskopa je fluorescenčni mikroskop (Denk in sod., 1990; Heintzmann in Ficz, 2006; Hell in Wichmann, 1994). Konfokalni mikroskop ne osvetljuje celotnega vzorca hkrati, temveč ga z laserskim žarkom pregledujemo v določeni optični ravnini (Heintzmann in Ficz, 2006). Vzbuje fluorescentno svetlobo iz točk sprejme detektor, ki informacijo s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Konfokalni mikroskop ima vgrajeno zaslonko, ki preprečujeta pot svetlobe iz vzorca do detektorja (Slika 3) (Földes-Papp in sod., 2003; Hell in Wichmann, 1994; Wilhelm in sod., 2014).



Slika 3: Shema sestavnih elementov konfokalnega mikroskopa (Wilhelm in sod., 2014: 29).

Ločljivost (resolucij) konfokalnega mikroskopa je omejena. Ostrino realne slike omejuje uklon svetlobe na končno velikih optičnih elementih, ki povzroči, da se podoba točkastega izvora razširi v niz Airyevih obročev (Heintzmann in Ficz, 2006; Rottenfusser in sod., 2014). Velikost Airyevih obročev je odvisna od valovne dolžine svetlobe, s katero osvetlujemo vzorec in od numerične aperture objektivna. Zmanjšamo ga tako, da za objektivom postavimo zaslon z majhno luknjico, ki prepusti žarke iz vzorca, medtem ko neželeno svetlobo zadrži (Slika 3) (Conchello in Lichtman, 2005; Heintzmann in Ficz, 2006). Ločljivost slike je tesno povezana z numerično aperturo objektivna. Če je numerična apertura večja (1,3), so Airyevi obroči manjši in slika je bolj ostra (Földes-Papp in sod., 2003; Heintzmann in Ficz, 2006; Rottenfusser in sod., 2014; Wilhelm in sod., 2014).

Dvofotonski konfokalni mikroskop vzbuja molekule z dvema fotonoma daljše valovne dolžine (Denk in sod., 1990). Molekula mora sočasno absorbirati dva fotona, da preide v višje energetske stanje, kar zagotovimo z veliko gostoto fotonov, oziroma z zelo veliko intenziteto svetlobe (Denk in sod., 1990; Helmchen in Denk, 2005; Navarro in sod., 2004), kar dosežemo z zbiranjem žarkov v gorišču. Posledično je intenziteta svetlobe dovolj velika, da pride do vzbujanja fotonov le v gorišču, hkrati pa se izognemo moteči svetlobi iz drugih delov vzorca (Denk in sod., 1994). Ker pri dvofotonskem mikroskopu vzbuja fotone z dvakrat daljšo valovno dolžino, je v primerjavi z navadnim konfokalnim mikroskopom tudi ločljivost slike posledično nekoliko manjša, medtem ko je sipanje fotonov manjše. Zato izbiro mikroskopa prilagodimo vzorcu: če je vzorec debel in se svetloba fotonov močno siplje, izberemo dvofotonski konfokalni mikroskop, v nasprotnem primeru pa enofotonski konfokalni mikroskop (Denk in sod., 1994).

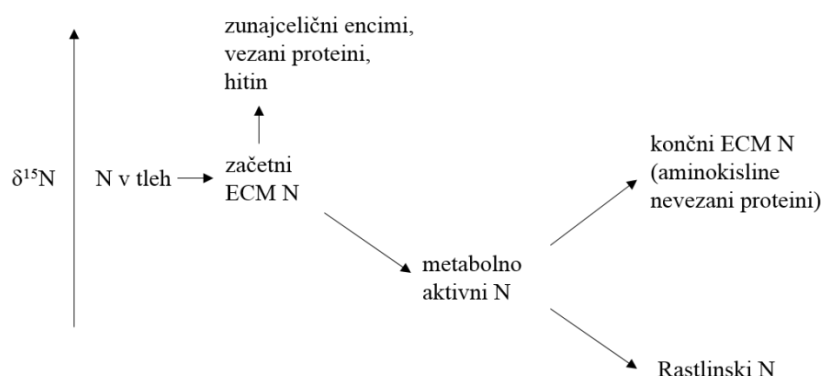
2.8 IZOTOPSKE ANALIZE OGLJIKA ($\delta^{13}\text{C}$) IN DUŠIKA ($\delta^{15}\text{N}$)

2.8.1 Izotopi dušika pri mikoriznih glivah

Izotope dušika (N) v naravnih komponentah je prvič omenil Hoering (1955), ki je s pomočjo masne spektroskopije in standardov definiral $\delta^{15}\text{N}$ v vzorcih: $\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [\text{R}_{\text{vzorec}}/\text{R}_{\text{zrak}}] - 1 \times 1000\text{‰}$, kjer je R vzorca razmerje med težjim in lažjim izotopom ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Standard za dušik je atmosferski N₂ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0,0036765$). Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v zraku za kopenske ekosisteme je med 20 in – 10 ‰ (Hobbie in Högberg, 2012). Razmerje stabilnih izotopov dušika v listih v naravnih ekosistemih je kazalec kroženja N (Amundson in sod., 2003; Robinson, 2001). $\delta^{15}\text{N}$ v listih je zelo variabilen v različnih ekosistemih (Hobbie in Högberg, 2012; Hobbie in sod., 2005), zaradi podnebnih vplivov in kroženja drugih hranil (Amundson in sod., 2003; Craine in sod., 2009), med vrstami (Hobbie in Högberg, 2012; Hobbie in sod., 2005; Lilleskov in sod., 2002) in zaradi antropogenih dejavnikov (Amundson in sod., 2003). Kljub temu je pri interpretaciji kroženja N in $\delta^{15}\text{N}$ v listih potrebno upoštevati: (1) vpliv mikoriznih gliv, ki lahko $\delta^{15}\text{N}$ v listih znižajo za 3 – 8 ‰ v primerjavi z nemikorinimi rastlinami (Hobbie in Högberg, 2012; Lilleskov in sod., 2002; Michelsen in sod., 1998), (2) vpliv podnebnih sprememb, predvsem nizkih povprečnih letnih padavin in visokih povprečnih letnih temperatur, ki povečajo $\delta^{15}\text{N}$ v listih (Amundson in sod., 2003) in (3) prisotnost N₂ – fiksirajočih bakterij v tleh, saj je med atmosferskim N in N, ki ga proizvajajo simbiotske

bakterije, nemogoče razlikovati, zato mnogi raziskovalci rastline, ki tvorijo simbiozo z N₂ – fiksirajočimi bakterijami izključujejo iz raziskav (Craine in sod., 2009; Hobbie in Högberg, 2012).

Poleg tega, da lahko na podlagi $\delta^{15}\text{N}$ v listih sklepamo o kroženju N, nam ta podatek prikazuje tudi razpoložljivost N v tleh (Cheng in sod., 2010). Če je N dovolj, se N iz sistema izgublja v osiromašeni obliki, kar poveča vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v listih. V nasprotnem primeru N v sistemu kroži, se primarno izgublja v organski obliki in vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ listov so nižje (Craine in sod., 2009). Večja razlika med $\delta^{15}\text{N}$ listov in substrata pomeni, da imajo rastline na voljo več organskega N, NH₄⁺ ali NO₃⁻ (Amundson in sod., 2003). Razpoložljivost N je lahko večja na območjih z nizko razpoložljivostjo fosforja (P) (Craine in sod., 2009). Na $\delta^{15}\text{N}$ listov in pomanjkanje N v tleh vplivajo tudi mikorizne glive, ki v primeru pomanjkanja N v substratu, rastlinam transportirajo osiromašen ¹⁵N (Hobbie in Colpaert, 2003). Mikorizne glive oskrbujejo rastline z organskimi oblikami N, ki imajo višje vrednosti ¹⁵N kot jih imajo sicer rastlinam dostopne anorganske oblike. Poleg tega mikorizne glive vgrajujejo težje oblike ¹⁵N, rastlinam pa transportirajo osiromašen ¹⁵N (Hobbie in Colpaert, 2003; Hobbie in Högberg, 2012) in zato imajo rastline z mikoriznimi simbionti nižje vrednosti ¹⁵N, kot rastline, ki so v interakciji s saprofitnimi glivami (Hobbie in Högberg, 2012) ali nemikorizne rastline (Michelsen in sod., 1998) (Slika 4).



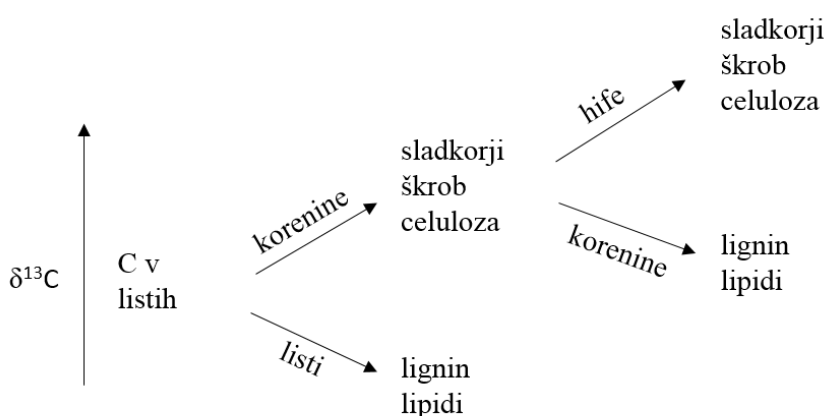
Slika 4: Pot dušika med ektomikoriznimi glivami, rastlino in substratom.

Na izotopsko sestavo N lahko vplivajo tudi funkcionalne skupine ektomikoriznih gliv (Hobbie in Agerer, 2010; Hobbie in Högberg, 2012; Lilleskov in sod., 2002). Lilleskov in sod. (2002) so dokazali, da sta lahko prisotnost rizomorfov in $\delta^{15}\text{N}$ povezana, saj so ugotovili, da je $\delta^{15}\text{N}$ eksploracijskih tipov (ET) na dolge razdalje (*Cortinarius* sp. in *Tricholoma* sp.)

višji kot pri ostalih vrstah. Hobbie in Agerer (2010) sta v raziskavi primerjala vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ med eksploracijskimi tipi, lastnostmi hif (hidrofobne in hidrofilne hife) in prisotnostjo rizomorfov. Ugotovila sta, da so mikorizne glive z ET na dolge (*Suillus* sp.) in srednje razdalje (pregrinjalni in resasti podtip) (*Hydnellum* sp. in *Cortinarius* sp.) za 4 – 7 ‰ bolj obogatene, kot mikorizne glive z ET na srednje (gladek podtip) (*Amanita* sp.) in kratke razdalje (*Inocybe* sp.) in kontaktni ET (*Hygrophorus* sp.). Prav tako so bile vrste s hidrofobnimi hifami in rizomorfi za 3 – 4 ‰ bolj obogatene od vrst s hidrofilnimi hifami ali brez rizomorfov.

2.8.2 Izotopi ogljika pri mikoriznih glivah

Mikorizne glive so glede na korenine in liste ^{13}C obogatene, kar je posledica transporta ogljikovih komponent od listov, preko korenin do mikoriznih gliv (Hobbie in Colpaert, 2004). Mobilne oblike ogljika v listih so ^{13}C obogatene (sladkorji, škrob), medtem ko so nemobilne oblike C (lignin, lipidi), ki ostajajo v tkivu, ^{13}C osiromašene (Slika 5). Bolj kot je tkivo oddaljeno od vira C, bolj je ^{13}C obogateno (Hobbie in Colpaert, 2004). Prav tako lahko glede na ^{13}C talnih profilov sklepamo, kolikšen delež snovi je bil transportiran od nadzemnega v podzemni del (Hobbie in Colpaert, 2004). Le Tacon in sod. (2013) so na primeru tartufov (*Tuber melanosporum* V.) dokazali, da rastline skoraj ves ogljik transportirajo do mikoriznih gliv, medtem ko same izkoristijo le 1 ‰ ogljika med rastno sezono.



Slika 5: Pot ogljika med listi, koreninami in mikoriznimi glivami.

Zeller in sod. (2007) so raziskovali ¹³C v trosnjakih ektomikoriznih in saprofitnih gliv. Ugotovili so, da so sporofori saprofitnih gliv obogateni s ¹³C glede na substrat, medtem ko lahko na osnovi $\delta^{13}\text{C}$ ektomikoriznih gliv sklepamo, da pridobivajo ogljik (C) od rastlin. Kljub temu pa obstajajo izjeme, kot je na primer *Lactarius* sp., ki ima $\delta^{13}\text{C}$ bolj podobno nemikoriznim koreninam, kar lahko pomeni, da del C pridobi iz organskih snovi v tleh. Handeley in sod. (1993) so ugotovili, da ektomikorizna gliva *Hydnaceum carneum* ne vpliva na $\delta^{13}\text{C}$ rastlinskih vrst iz rodu *Eucalyptus*. Podobno sta ugotovila tudi Hobbie in Colpaert (2004) za ektomikorizno glivo *Telephora* sp. na boru (*Pinus sylvestris*), medtem ko *Suillus* sp. poveča $\delta^{13}\text{C}$ v celotnem sistemu. $\delta^{13}\text{C}$ mikoriznih gliv se lahko razlikuje tudi zaradi različne sestave ¹³C fotosintatov, ki jih vežejo rastline med fotosintezo (Zeller in sod., 2007).

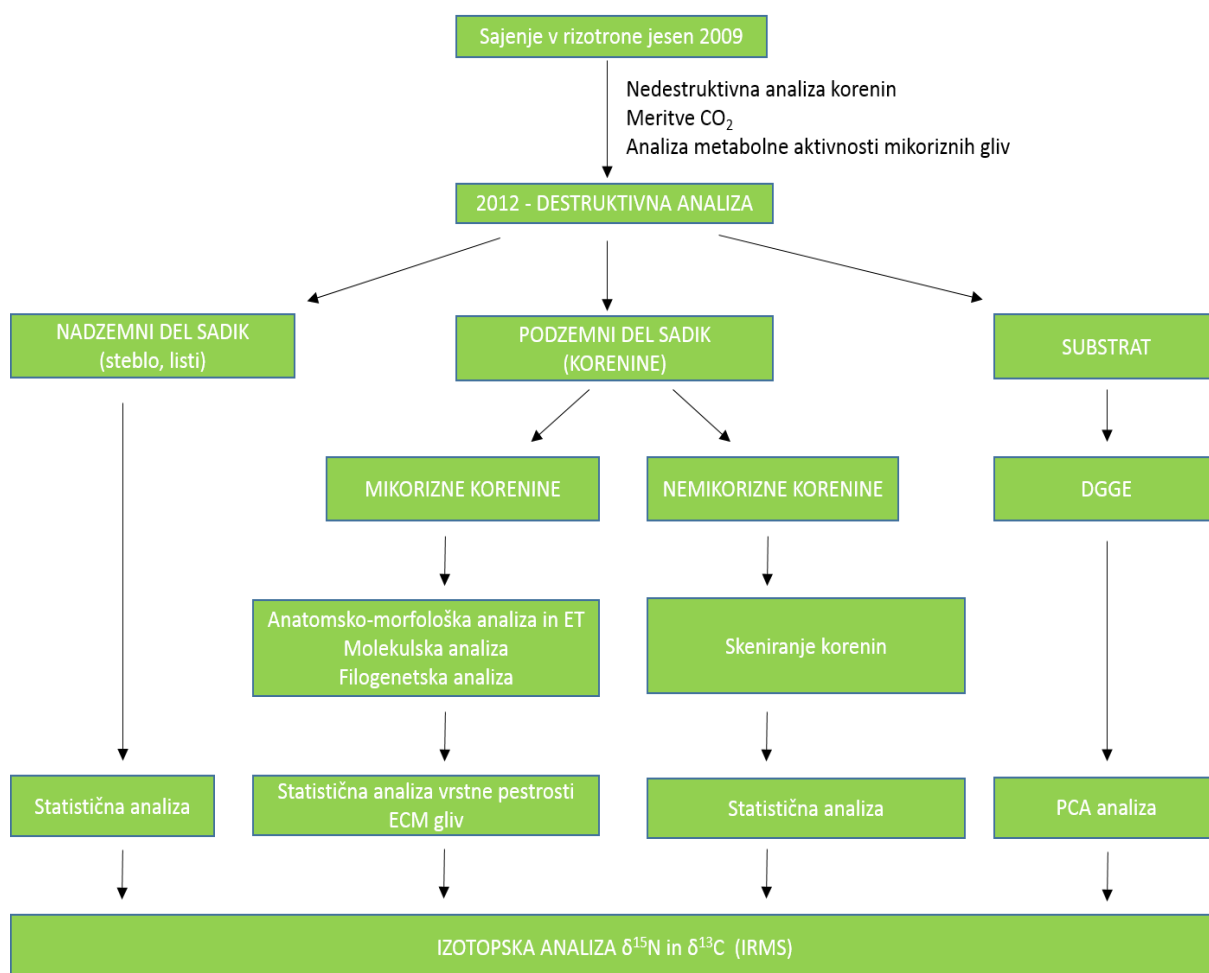
Na $\delta^{13}\text{C}$ vpliva tudi koncentracija N v substratu (Hobbie in Colpaert, 2003; Hobbie in Colpaert, 2004), večje koncentracije dušika v fotosintetskem tkivu povečajo fiksacijo C in zmanjšajo koncentracije CO₂ v tkivu. S tem pojavom so povezane mikorizne glive, ki lahko vplivajo na tok C tako, da je večji delež C namenjen respiratornim procesom kot skladiščenju. Poleg tega manjše razmerje C:N v mikoriznih glivah kot v rastlinah pomeni, da je manj N namenjenega rasti nadzemnega dela rastline, kot takrat ko rastline transportirajo do korenin večje količine C (Hobbie in Colpaert, 2004).

Dawson in sod. (2002) so dokazali, da je vpliv rastne sezone povezan z znižanimi vrednostmi $\delta^{13}\text{C}$. Vrednosti ¹³C v listih se spreminjajo glede na vlago v tleh, zračno vlažnost, temperaturo in dolžino sončnega obsevanja. Razlike v $\delta^{13}\text{CO}_2$ zaradi zmanjšane fotosinteze, kot posledice nižjih temperatur in slabše svetlobe, oziroma zaradi zaprtih listnih rež ob sušnem stresu, so Farquhar in sod. (1989) dokazali že leta 1989. Podobno so za $\delta^{13}\text{C}$ v sporokarpnih mikoriznih gliv dokazali Taylor in sod. (2003).

3 MATERIAL IN METODE

Del doktorske naloge se nanaša na že postavljene poskusne pogoje in metode iz diplomske naloge Štraus (2010), kjer smo na enoletnih sadikah bukve posajenih v rizotrone od spomladi 2009 do spomladi 2010, spremljali pojavljanje ektomikoriznih gliv pri bukvi. Skupaj smo identificirali 7 tipov ektomikorize iz rodov *Hebeloma* sp., *Peziza* sp., *Tuber* sp., *Leptodontidium* sp., *Scleroderma* sp. in *Cenococcum* sp.

Za lažji pregled metod dela, ki smo jih izvajali tekom poskusa te doktorske naloge, smo pripravili organizacijsko shemo (Slika 6).



Slika 6: Organizacijska shema metod dela, ki smo jih izvajali pri doktorski nalogi.

3.1 OPIS SADIK

Tretma smo zastavili na enoletnih sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.), provenienca Osankarica, vzgojna oblika 1/0, GSO 2.0119, ki so bile vzgojene v drevesnici Omorika, Muta. V drevesnici Omorika so pred setvijo semena zemljo tretirali z basamidom. Basamid se uporablja za zatiranje nematodov na sadikah, v rastlinjakih in kalilnikih. Na ta način so zemljo razkužili, odstranili glive, bakterije, seme plevela in insekte. Seme so novembra 2008 v vrsticah sejali 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. Jeseni 2009 smo enoletne sadike prepeljali na Gozdarski inštitut Slovenije, kjer so v skupni posodi z vodo čakale na zasaditev v rizotrone, kjer je lahko prišlo do dodatne okužbe oziroma izmenjave mikoriznih gliv med sadikami. Sadike smo posadili v steklene rizotrone (zunanje dimenzije 30x50x3 cm, notranje dimenzije 28x49x2 cm), ki smo jih izpostavili štitim različnim temperaturam (dva tretmaja v klimatizirani komori z dnevno temperaturo 15-20 °C, kjer je imel eden od tretmajev dodatno hlajen predel korenin za 4-5 °C, tretma v rastlinjaku in tetma zunaj). Tekom poskusa smo mesečno izvajali nedestruktivne analize korenin s slikanjem rizotronov in analize metabolne aktivnosti mikoriznih gliv z uporabo dvofotonskega konfokalnega mikroskopa in komercialnega fluorescentnega barvila ELF-97. Sadike so v rizotronih so rastle tri leta, do leta 2012, ko smo naredili destruktivno analizo podzemnega in nadzemnega dela. Pod lupo smo pregledali koreninske sisteme, ločili mikorizne korenine od nemikoriznih in skenirali korenine za izračun koreninskih indeksov. Primerjali smo tudi nadzemno biomaso sadik bukve med posameznimi temperaturnimi tretmaji. Nadaljevali smo z identifikacijo mikoriznih gliv v tretmajih s tremi različnimi metodami: anatomsko-morfološko metodo, molekulskimi metodami in filogenetskimi analizami. Za ugotavljanje pestrosti ektomikoriznih gliv v substratu smo uporabili metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturantov (DGGE). V posameznih kompartmentih rastlinskega in mikoriznega tkiva, ter v substratu smo z masnim spektrometrom za stabilne izotope (IRMS, *ang. Isotope-ratio mass spectrometry*) izmerili izotopske vrednosti ogljika ($\delta^{13}\text{C}$) in dušika ($\delta^{15}\text{N}$), da bi ugotovili pot ogljika od listov bukve do mikoriznih gliv oziroma pot dušika od mikoriznih gliv do listov rastlin. Z uporabo dvofotonskega konfokalnega mikroskopa in komercialnega fluorescentnega barvila ELF-97 smo ugotavljali pojavljanje in razporeditev na površino vezane fosfataze pri mikoriznih glivah.

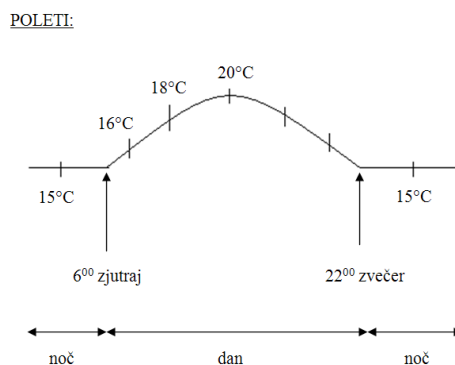
3.2 POSTAVITEV POSKUSA

3.2.1 Sajenje sadik v rizotrone in priprava substrata

Koreninski sistem sadik bukve smo pred sajenjem v rizotrone previdno oprali pod tekočo vodo. Nato smo predel korenin skenirali s skenerjem (EPSON Perfection V700 PHOTO, Indonezija) v programu WinRhizo®. Med skeniranjem smo pri sadikah, kjer smo opazili mikorizne glive, le te vzorčili za molekulske analize. V vsak tretma smo vključili po 17 sadik (17 rizotronov), ki smo jih zložili v lesena stojala (zabojnike), kjer je predel korenin zaščiten pred svetlobo (Štraus, 2010). Za sajenje smo uporabili za to posebej pripravljen pasteriziran substrat, ki 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. Na dno rizotropa smo dali kremenčev pesek, zrnatosti od 0,3 do 0,5 cm, ki je služil za drenažo. Pesek smo pred uporabo sprali z vodo. Substrat služi kot vir hranil in mineralov za rastline, hkrati pa je to mesto, kjer se razraščajo korenine. Pri sajenju smo pazili, da smo koreninski sistem čim manj poškodovali.

3.2.2 Opisi pogojev v tretmajih

Poskusne razmere, v katerih so rastle sadike, so enake kot pri diplomskem delu (Štraus, 2010). V klimatizirani komori (IMP klima, Godovič, Slovenija) je bilo gojenih 34 sadik, polovica od njih je bila izpostavljena dodatnemu hlajenju (CR+) koreninskega predela, medtem ko preostanek sadik ni bil dodatno hlajen (CR-). Sadike so bile izpostavljene umetni svetlobi v območju $90 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dolžino dneva in noči smo tedensko spreminjali po podatkih Agencije Republike Slovenije za okolje (Agencija republike Slovenije... , 2014) glede na naravni dnevni režim. Temperatura zraka tekom dneva je bila avtomatsko regulirana, ponoči 15°C, čez dan je naraščala do 20°C in zvečer spet padla na 15°C (Slika 7). Temperatura v koreninskem predelu sadik, ki so bile izpostavljene dodatnemu hlajenju, je bila za 4-5°C nižja od temperature zraka.



Slika 7: Spreminjanje temperature in svetlobe tekom dneva v klimatizirani komori (Štraus, 2010: 21)

Poleg sadih v klimatizirani komori je 17 sadih rastlo v rastlinjaku (GH) in dodatnih 17 zunaj (OUT), vendar so bile le-te zaščitene pred padavinami. V obeh primerih so bile sadike izpostavljene naravni dnevni svetlobi in naravnemu režimu dnevne svetlobe. V poletnem času smo sadike v rastlinjaku pred premočnim sončnim obsevanjem zaščitili s senčili. Koreninski sistem sadih, ki so bile zunaj, smo pred zamrzovanjem in pregrevanjem zaščitili z alu-folijo in stekleno volno, pritrjeno na lesen zabojnik, medtem ko smo sadike v rastlinjaku pred pregrevanjem zaščitili le z alu-folijo, nameščeno na lesen zabojnik. Vse sadike so bile zalivane z avtomatskim zalivalnim sistemom, ki je vzdrževal vlago substrata tekom rastne sezone na 10-15 %. Temperaturo substrata na globini -20 cm smo beležili z uporabo kalibriranih digitalnih temperaturnih senzorjev DS18B20, povezanih na zapisovalnik podatkov, ki smo ga razvili na Gozdarskem inštitutu Slovenije (Lab za elektronske sisteme, vodja dr. M. Ferlan). Temperaturo in vlažnost zraka smo zajemali z USB zapisovalniki podatkov Voltcraft® DL-120 TH (Conrad Electronic UK Ltd, Barking, UK).

V klimatizirani komori in v rastlinjaku smo izmerili povišane koncentracije CO₂, ker nismo zagotovili prezračevalnega sistema. Koncentracije CO₂ so bile merjene dnevno med 11.00 – 14.00 tekom rastne sezone v letu 2011 z uporabo infrardečega analizatorja zraka Li-840 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE). Podatke je statistično in grafično obdelal dr. Mitja Ferlan iz Gozdarskega inštituta Slovenije (oddelek za gozdno ekologijo). Podatki za temperaturo zraka in substrata, relativno zračno vlažnost in koncentracije CO₂ so prikazani v Preglednica 3.

Preglednica 3: Rastne razmere v tretmajih: temperatura zraka in zračna vlaga od leta 2010 do 2012, temperatura tal na globini -20 cm od leta 2010 do 2012 in koncentracije CO₂ za leto 2011. CR+: dodatno hlajenje koreninskega predela, CR-: brez dodatnega hlajenja koreninskega predela, GH: rastlinjak, OUT: zunaj. n: število meritev

Temperatura zraka (°C)				Zračna vlaga RH (%)				CO ₂ koncentracija (ppm)				
	Povprečje ± SD	Min.	Max.	Povprečje ± SD	Min.	Max.	Povprečje ± SD	Min.	Max.	Povprečje ± SD	Min.	Max.
Klimatizirana CR+	16.0 ± 2.3	13.4	30.1	77.3 ± 5.6	0.5	90.9	671 ± 214	445				1548
komora CR-												
Rastl. (GH)	20.1 ± 7.4	10.9	47.1	56.1 ± 14.0	10.3	86.1	532 ± 80	415				792
Lopa (OUT)	10.2 ± 9.0	-12.0	29.6	79.4 ± 15.4	17.8	99.7	413 ± 25	364				482
n	38683			3863			80					

3.3 NEDESTRUKTIVNA ANALIZA KORENINSKEGA SISTEMA

Nedestruktivne analize rasti in razvoja korenin in mikorize sadik bukve smo analizirali s pomočjo slik rizotronov. Rizotrone smo mesečno fotografirali z digitalnim fotoaparatom (EOS 500D, Canon, Japonska). Pri slikanju je bil fotoaparat od rizotronov oddaljen 122 cm. Slike smo pregledali s programom Rootfly[®] (Wells in Birchfield, 2011) po postopku, opisanem v Štraus in sod. (2012). Rezultate smo uredili v ustrezni bazi podatkov za nadaljnje analize rasti korenin. V analize s programom Rootfly[®] (Wells in Birchfield, 2011) smo za tretmaje CR+, CR- in GH vključili podatke za mesec maj iz leta 2010 in november iz leta 2011, medtem ko smo za OUT uporabili podatke meritev iz novembra 2010 in novembra 2011. Za statistični prikaz podatkov dolžine korenin smo po transformaciji podatkov izbrali faktorsko analizo variance (Factorial ANOVA) in Post-Hoc test mnogoterih primerjav - Tukey test, medtem ko smo za premer korenin izbrali neparametrični test (Kruskal-Wallis test).

3.4 DESTRUKTIVNA ANALIZA SADIK BUKVE IN SUBSTRATA

3.4.1 Analiza nadzemnega dela sadik bukve po destruktivni analizi

Vse analize rastnih parametrov je opravila dr. Tanja Mrak iz oddelka za gozdno fiziologijo in genetiko na Gozdarskem inštitutu Slovenije izključno za potrebe te doktorske naloge. Iz pridobljenih podatkov po destruktivni analizi sadik smo izračunali naslednje rastne parametre: specifična listna površina (SLA; razmerje med listno površino in listno težo), razmerje listne površine (LAR; razmerje med listno površino in skupno težo sadik), specifična dolžina korenin (SRL; razmerje med dolžino in težo korenin) (Ostonen in sod., 2007), gostota koreninskih vršičkov (število koreninskih vršičkov na cm dolžine korenin), specifična gostota koreninskih vršičkov (število koreninskih vršičkov na težo korenin), gostota razraščanja (število koreninskih vej na cm dolžine korenin).

3.4.1.1 Specifična listna površina – SLA (m² kg⁻¹)

Specifično listno površino (*angl. Specific leaf area*) smo izračunali kot delež listne površine na težo listov:

$$\text{Specifična listna površina} = \frac{\text{listna površina}}{\text{masa listov}} \quad \dots(1)$$

3.4.1.2 Razmerje listne površine – LAR (m² kg⁻¹)

Razmerje listne površine smo izračunali kot listno površino na skupno težo sadik:

$$\text{Razmerje listne površine} = \frac{\text{listna površina}}{\text{skupna masa sadik}} \quad \dots(2)$$

3.4.1.3 Specifična dolžina korenin – SRL (m g⁻¹)

Specifično dolžino korenin smo izračunali kot dolžino korenin na težo korenin (Ostonen in sod., 2007):

$$\text{Specifična dolžina korenin} = \frac{\text{dolžina korenin}}{\text{masa korenin}} \quad \dots(3)$$

3.4.1.4 Gostota koreninskih vršičkov

Gostoto koreninskih vršičkov smo izračunali kot razmerje med številom koreninskih vršičkov in dolžino korenin:

$$\text{Gostota koreninskih vršičkov} = \frac{\text{št. koreninskih vršičkov}}{\text{dolžina korenin}} \quad \dots(4)$$

3.4.1.5 Specifična gostota koreninskih vršičkov

Specifično gostoto koreninskih vršičkov smo izračunali kot razmerje med številom koreninskih vršičkov in težo korenin:

$$\text{Specifična gostota koreninskih vršičkov} = \frac{\text{št. koreninskih vršičkov}}{\text{masa korenin}} \quad \dots(5)$$

3.4.1.6 Gostota razraščanja

Gostoto razraščanja smo podali kot število koreninskih vej na centimeter dolžine korenin:

$$\text{Gostota razraščanja} = \frac{\text{št. koreninskih razvejitev}}{\text{cm dolžine korenin}} \quad \dots(6)$$

3.4.2 Analiza koreninskega sistema – mikorizne in nemikorizne korenine

Ob zaključku poskusa leta 2012, smo sadike pobrali iz rizotronov, vzporedno po dve sadiki naenkrat za vsak temperaturni tretma. Koreninski sistem smo ločili od nadzemnega dela, ga sprali z vodo, da smo odstranili večje dele substrata, in ga shranili v banjici z vodo na 5°C. S pomočjo stereo lupe (Olympus, SZX12, vir svetlobe Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlobo) smo odstranili še preostale delce substrata. Celoten koreninski sistem smo pregledali, prešteli število koreninskih vršičkov, daljših od 2 mm, ločili mikorizne koreninske vršičke od nemikoriznih in skenirali s skenerjem (EPSON Perfection V700 PHOTO) v programu WinRHIZO[®] (v2002c, Régent Instruments Inc., Kanada). Med pregledovanjem smo odvzeli nekaj mikoriznih vršičkov za molekulske analize mikoriznih gliv, ki smo jih shranili v mikrocentrifugirkah (1,5 ml) s 400 µl ekstrakcijskega pufra AP1. Koreninske sisteme smo posušili in tehtali suho težo korenin za nadaljnje izračune indeksov rasti korenin.

3.4.2.1 Število mikoriznih in nemikoriznih koreninskih vršičkov

Pri štetju mikoriznih in nemikoriznih koreninskih vršičkov smo upoštevali koreninske vršičke, daljše od 2 mm. Koreninske vršičke smo šteli ročno s pomočjo namizne lupe in s programom WinRHIZO® (v2002c, Régent Instruments Inc., Kanada), ki avtomatsko izmeri različne parametre korenin, kot so dolžina korenin, premer, površina, volumen in število koreninskih vršičkov.

3.4.3 Analiza mikoriznih korenin – identifikacija z anatomsko-morfološko metodo

V nadaljevanju opisani postopki identifikacije ektomikoriznih gliv v poskusu so enaki kot pri diplomskem delu Štraus (2010). Tipe ektomikorize (ECM) smo določevali po anatomskih in morfoloških lastnostih glede na objavljene opise (Agerer, 1987-2008) po metodologiji, opisani v Kraigher (1996), s pomočjo stereo lupe (Olympus, SZX12, vir svetlobe Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlobo) in mikroskopa (Olympus, BX51, povečava 100-2000x). 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.

3.4.4 Analiza mikoriznih korenin - identifikacija gliv v ektomikorizi z uporabo molekulskih markerjev

3.4.4.1 Ekstrakcija DNA

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

Pred začetkom ekstrakcije smo preverili naslednje razmere:

- 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

- V pufru AW in AP3/E je dodan etanol
- 1. V mikrocentrifugirke (1,5 ml) smo odpipetirali 400 µl pufra AP1.
- 2. Posamezno vrsto mikoriznih gliv smo ločeno dali v mikrocentrifugirke z ekstrakcijskim pufrom, pri čemer smo pazili, da je bilo dovolj glivnega materiala za ekstrakcijo DNA.
- 3. S pomočjo mikro pestila smo strli mikorizne vršičke.
- 4. Dodali smo 4 µl Rnase A, vrtinčili in inkubirali v vodni kopeli najmanj 10 minut (največ 60 min).
- 5. Dodali smo 130 µl pufra AP2, vrtinčili in inkubirali 15 min na ledu (v zamrzovalniku) in centrifugirali 5 min na 20.000 x g.
- 6. Označili smo QIAshredder Mini mikrocentrifugirke (2 ml), vanje previdno odpipetirali supernatant, da nismo zajeli usedline in centrifugirali 2 min na 20.000 x g.
- 7. Označili smo nove mikrocentrifugirke (1,5 ml), vanje odpipetirali supernatant, dodali 1.5x volumen pufra AP3/E in premešali s pipeto.
- 8. Označili smo Dneasy Mini mikrocentrifugirke (2 ml) in vanje odpipetirali 600 µl mešanice iz točke 7.
- 9. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti (≥20 000. x g). Tekočino v mikrocentrifugirki smo zavrgli in mikrocentrifugirke ponovno uporabili.
- 10. Ponovili smo točko 7 s preostalo mešanico.
- 11. Kolone s filtrom smo postavili v mikrocentrifugirke (uporabi stare), dodali 500 µl pufra AW, ki mora vsebovati etanol in centrifugirali 2 minuti na maksimalni hitrosti.
- 12. Supernatant smo zavrgli, del kolone s filtrom smo prenesli v nove mikrocentrifugirke, ki smo jih prej označili.
- 13. Dodali smo 250 µl pufra AW in centrifugirali 2 minuti na maksimalni hitrosti.
- 14. Del kolone s filtrom smo prenesli na nove označene mikrocentrifugirke (1.5 ml), dodali 100 µl pufra AE (segret na 65°C), inkubirali pri sobni temperaturi 5 minut in centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti.
- 15. Dodali smo 100 µl AE pufra, inkubirali na sobni temperaturi 5 minut in centrifugirali 1 minuto pri maksimalni hitrosti.
- 16. Del centrifugirke s filtrom smo zavrgli in preverili, če so centrifugirke z ekstraktom DNA pravilno označene: E12/X_Y (E - ekstrakcija, 12 – leto izvajanja ekstrakcije, X - zaporedna številka ekstrakcije, Y - 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.

3.4.4.2 Pomnoževanje DNA

S polimerazno verižno reakcijo smo pomnoževali ITS1, ITS2 in 5,8S rDNA regije v genomu višjih gliv. V reakcijsko mešanico (25 µl) (Preglednica 4) smo dodali prepisni začetni oligonukleotid ITS1f (Invitrogen, ZDA) in protiprepisni začetni oligonukleotid ITS4 (Invitrogen, ZDA) (Preglednica 5), 10-kratni PCR Gold pufer, 50 µM vsakega deoksiribonukleozid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Applied Biosystems, ZDA), 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, ZDA), DNA polimerazo AmpliTaq[®] Gold (Applied Biosystems, ZDA in 2,5 µl ekstrahirane DNA. Reakcije pomnoževanja smo izvedli v termostatu GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, ZDA), po programu iz Preglednica 6 (SOP 1-molekularna identifikacija, LABFIGE, GIS). Za vsako skupino reakcij smo pripravili tudi negativno kontrolno reakcijo, kjer smo vzorčno DNA nadomestili s sterilno destilirano vodo za celične kulture.

Preglednica 4: 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 (50 mM)	Applied Biosystems	2,5
MgCl₂ (25 mM)	Roche	2,5
oba začetna oligonukleotida (10 µM)	Invitrogen	0,8 vsakega
polimeraza AmpliTaq[®] Gold (1 enot na µl)	Roche	0,2
Raztopina ekstrahirane DNA		2,5
sterilna destilirana voda	Gibco	13,2
Končni volumen PCR		25 µl

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in sekvenčni reakciji.

Oznaka	Nukleotidno zaporedje	T _m (° C)	Vir
ITS1-F	5' –CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A– 3'	55	(Primer sequences ... , 2002)
ITS4	5' –TCC GCT TAT TGA TAT GC– 3'	53	(White in sod., 1990)

Preglednica 6: PCR program za pomnoževanje ITS regij.

Stopnja	Število ciklov	T (sek), T (°C)
začetna denaturacija		300 sek./95°C
denaturacija		45 sek./94°C
naleganje zač. oligonukleotidov	13	55 sek./55°C
podaljševanje DNA verige		45 sek./72°C
denaturacija		45 sek./94°C
naleganje zač. oligonukleotidov	13	55 sek./55°C
podaljševanje DNA verige		120 sek./72°C
denaturacija		45 sek./94°C
naleganje zač. oligonukleotidov	12	55 sek./55°C
podaljševanje DNA verige		600 sek./72°C
končno podaljševanje		600 sek./72°C
hranjenje vzorcev do uporabe		4°C

3.4.4.3 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). Na gel smo nanесли 5 µl PCR mešanice. Uporabljali smo 1,5-odstotne (w/v) agarozne gele. Polimerizacija je potekala pri sobni temperaturi. Elektroforezno ločevanje je potekalo 60 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, ZDA) koncentracije 500 ng/ml in jih nato spirali 15 minut pod tekočo vodo v banjici. Gele smo pregledovali v transiluminatorju Gel Doc EQ System, PC (BioRad, ZDA) 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, ZDA).

3.4.4.4 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, ZDA) smo s sterilnim skalpelom izrezovali proge tarčnih PCR pomnožkov ustreznih dolžin in jih osamili s kompletom za osamitev in čiščenje nukleinskih kislin iz agaroznega gela (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, PROMEGA, ZDA) po navodilih proizvajalca. V sekvenciranje smo skupno poslali 148 vzorcev DNA.

3.4.4.5 Sekvenciranje in sekvenčna analiza DNA

Za vse vzorce tipov ektomikorize smo sekvencirali pomnožke z enakimi pari začetnih oligonukleotidov (ITS1F/ITS4) ITS regije v genomski rDNA, s katerimi smo že v osnovi izvedli PCR. Vzorce DNA smo poslali v komercialni sekvenčni laboratorij (Macrogen inc., Amsterdam, Nizozemska). Sekvenciranje DNA je potekalo v obe smeri (bidirectional sequencing). Dobljene kromatograme po sekvenciranju smo ročno analizirali s programom FinchTV 1.4. Pridobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi podatkov Genbank z algoritmom BLAST (Altschul in sod., 1990) implementiranim v spletnem orodju 'nucleotide BLAST, blastn' na spletni strani NCBI.

3.4.5 Analiza mikoriznih korenin - identifikacija gliv v ektomikorizi z izdelovanjem dendrogramov

Urejene sekvence izbranih PCR pomnožkov smo med seboj primerjali s sekvencami iz spletnih baz GenBank in UNITE s programom MAFFT (Multiple Sequence Alignment Program, online version 6) (Kato in Standley, 2013). Filogenetske odnose smo ugotavljali z metodo največjega verjetja (»maximum likelihood«). S programom MEGA[®] 6.0 (Tamura in sod., 2013) smo poiskali najbolj optimalen model nukleotidnih substitucij glede na popravljeni Akaikejev kriterij informativnosti (AICc). Izbrani model smo uporabili za izdelavo filogenetskih dreves po metodi Maximum Likelihood (2000 Bootstrap).

Filogenetske analize za rod *Tuber* je opravil dr. Tine Grebenc. Sekvence PCR pomnožkov je med seboj primerjal s programom MAFFT v6.859 (G-ins-I strategy) (Multiple Sequence Alignment Program, online version 6) (Kato in Standley, 2013). S programom MEGA 5.0 je poiskal najboljši nukleoditni substitucijski model (Tamura 3 parametrični model) (Tamura, 1992) in ga uporabil za izdelavo filogenetskega drevesa po metodi Maximum Likelihood (1000 Bootstrap).

3.4.6 Analiza mikoriznih korenin - statistična analiza pestrosti ektomikoriznih gliv

Za vsako sadiko bukve v tretmaju smo po destruktivnem vzorčenju naredili analizo nadzemnega in podzemnega dela. Izračunali smo različne indekse korenin in nadzemnega dela in ugotavljali parametre za oceno vrstne pestrosti mikoriznih gliv.

3.4.6.1 Delež posameznih tipov ektomikorize v celotnem poskusu

Delež posameznega tipa ektomikorize v celotnem poskusu smo izračunali glede na število vseh ECM tipov v celotnem poskusu.

$$\% \text{ ECM tipa v poskusu} = \frac{\text{št. k.k. ECM tipa}}{\text{št. vseh ECM k.k.}} \quad \dots(7)$$

3.4.6.2 Delež posameznih tipov ektomikorize v posameznem tretmaju

Delež posameznega tipa ektomikorize v posameznem tretmaju smo izračunali glede na število vseh ektomikoriznih tipov v posameznem tretmaju.

$$\% \text{ ECM tipa v tretmaju} = \frac{\text{št. k.k. posameznega ECM tipa}}{\text{št. ECM k.k. v tretmaju}} \quad \dots(8)$$

3.4.6.3 Delež ektomikoriznih kratkih korenin v posameznem tretmaju

Delež ektomikoriznih kratkih korenin v posameznem tretmaju smo izračunali glede na vse kratke korenine v tretmaju (mikorizne in nemikorizne kratke korenine).

$$\% ECM \text{ k.k. v tretmaju} = \frac{\text{št. k.k. v posameznem tretmaju}}{\text{št. vseh ECM k.k. v tretmaju}} \quad \dots(9)$$

3.4.6.4 Delež nemikoriznih (NM) kratkih korenin v posameznem tretmaju

Delež nemikoriznih (NM) kratkih korenin v posameznem tretmaju smo izračunali glede na vse kratke korenine v posameznem tretmaju.

$$\% NM \text{ k.k. v tretmaju} = \frac{\text{št. NM k.k. v tretmaju}}{\text{št. vseh k.k. v tretmaju}} \quad \dots(10)$$

3.4.6.5 Indeks vrstne pestrosti (d)

Indeks vrstne pestrosti smo izračunali po formuli objavljeni v (Atlas in Bartha, 1981):

$$d = \frac{(S-1)}{\log(10) N} \quad \dots(11)$$

S – število tipov ektomikorize v vzorcu

N – število vseh vitalnih ektomikoriznih korenin

3.4.6.6 Shannon – Weaverjev indeks vrstne pestrosti (H)

Shannon – Weaverjev indeks vrstne pestrosti smo izračunali po formuli objavljeni v (Atlas in Bartha, 1981):

$$H = \frac{C}{N(N \cdot \log(10)N - \sum n_i \cdot \log(10)n_i)} = - \sum p_i \cdot \log(10) p_i \quad \dots(12)$$

C – 2,3 (korekcijski koeficient)

N – število vseh vitalnih ektomikoriznih kratkih korenin

n_i – število mikoriznih kratkih korenin posameznega tipa ektomikorize

p_i – delež osebkov glede na število vseh osebkov

3.4.6.7 Uravnoveženost (e)

Indeks uravnoveženosti smo izračunali po formuli objavljeni v (Atlas in Bartha, 1981):

$$e = \frac{H}{\log(10) S} \quad \dots(13)$$

H – Shannon – Weaverjev indeks vrstne pestrosti

S – število tipov ektomikorize v vzorcu

3.4.6.8 Statistične analize pliva okoljskih dejavnikov (temperature in povišanih koncentracij CO₂) na pestrost ECM združbe

Analize vpliva okoljskih dejavnikov, v našem primeru temperature in CO₂, smo opravili v programu PSPP (Darrington in sod., 2011). Analize je izvedel Domen Finžgar iz Gozdarskega inštituta Slovenije. Izbrali smo tri različne metode:

1. Metoda kontingenčnih tabel, s katero smo preverjali dejanske in pričakovane frekvenčne vrednosti posamezne ECM glive znotraj posameznega okolja (tretmaja) na χ^2 porazdelitvi pri določenih stopinjah prostosti. Ker je metoda izjemno občutljiva na minimalne spremembe frekvenc, smo pri uporabi ocenjevanja štetja ECM gliv upoštevali $\alpha=0,10$.
- 2.
3. Neparametrična metoda Kruskal Wallis, s katero smo preverili, ali so med aritmetičnimi sredinami posameznih tretmajev statistično značilne razlike in Mann-Whitney U test, s katerim smo dodatno preverili posamezne pare tretmajev.
4. Multipla regresija, s katero smo želeli ločeno preveriti vpliv temperature in CO₂ na pestrost ECM gliv.

3.4.6.9 Statistična analiza vpliva različnih eksploracijskih tipov na rast nadzemnih in podzemnih delov sadik.

Vpliv različnih eksploracijskih tipov smo preverili z metodo multiple regresije v programu PSPP (Darrington in sod., 2011), kjer smo kot prediktorje izpostavili posamezne eksploracijske tipe, kot odvisno spremenljivko pa smo preučevali maso nadzemnega dela (suha masa listov in poganjkov) in maso podzemnega dela (skupna suha masa korenin).

3.4.7 Analiza združb ektomikoriznih gliv v substratu z gelsko elektroforezo v gradientu denaturantov (DGGE)

Analize združb ektomikoriznih gliv v substratu z gelsko elektroforezo v gradientu denaturantov (DGGE) je v celoti opravil Marko Bajc iz oddelka za gozdno fiziologijo in genetiko v laboratorijih Gozdarskega inštituta Slovenije za potrebe doktorske naloge.

3.4.7.1 Odvzemanje vzorcev substrata

Vzorci substrata smo 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.

3.4.7.2 Ekstrakcija DNA iz substrata

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 DNA iz zemlje (Power Soil DNA Isolation Kit, MO BIO) smo po navodilih proizvajalca ekstrahirali DNA iz 0.25 g vzorca substrata.

3.4.7.3 Pomnoževanje DNA

S polimerazno verižno reakcijo smo pomnoževali ITS1, del 28S rDNA na začetku in 5,8S rDNA na koncu regije v genomu višjih gliv. V reakcijsko mešanico (Preglednica 7) smo dodali začetna oligonukleotida ITS1-gc in ITS2 (Preglednica 8) in ekstrahirano DNA iz vzorcev substrata. DNA, izolirano iz vzorcev substrata, smo pred pomnoževanjem 5-krat redčili, saj smo empirično ugotovili, da je uspešnost PCR pri tej redčitvi najboljša. V reakcijsko mešanico smo dodali po 1 µl 5-kratne redčitve DNA za posamezen vzorec. Reakcije pomnoževanja smo izvedli na GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), po programu iz Preglednica 9. Po končani PCR reakciji smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

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

	Proizvajalec	Količina (µl)	Koncentracija
10x PCR Gold Buffer	Roche	2,5	1×
GeneAmp®dNTP (2 mM)	Applied Biosystems	2,5	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	Roche	2,5	2,5 mM
oba začetna oligonukleotida (10 µM)	Invitrogen	0,8 vsakega	0,32 µM
polimeraza AmpliTaq Gold® (5 enot na µl)	Roche	0,2	0,2 enote/µl
Raztopina ekstrahirane DNA		1,0	-
sterilna destilirana voda	Gibco	14,7 (do 25 µl)	-
Končni volumen PCR		25 µl	

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in DGGE

Oznaka	Zaporedje baznih parov	T _m (° 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) in Muyzer in sod. (1993)
ITS2	5' -GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC- 3'	57	Originalni vir: White in sod. (1990); http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tou/r/primers.html

Preglednica 9: 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 DNA verige	90 sek./72°C
končno podaljševanje		10 min/72°C
hranjenje vzorcev do uporabe		4°C

3.4.7.4 Ločevanje vzorcev z DGGE

S pomočjo gelske elektroforeze v gradientu denaturantov (DGGE) smo želeli primerjati tipe ektomikorize na koreninskem sistemu z združbo gliv v substratu. Za elektroforetsko ločitev pomnožkov z DGGE smo uporabili sistem DCodeTM (Bio-Rad, ZDA). 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. Denaturacijski gradient je bil 20 % (1.4M Urea, 8 % formamid) – 60 % (4,2M Urea, 24 % formamid) (Preglednica 10, Preglednica 11).

Preglednica 10: Snovi in količine za pripravo akrilamidnih raztopin z 0 in 100 odstotki denaturantov.

	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 11: Volumni 0 in 100-odstotne raztopine za pripravo denaturacijskega gradienta 20 % - 60 %.

	100 %	0 %	Σ
20 %	3,0 ml	12,0 ml	15,0 ml
60 %	9,0 ml	6,0 ml	15,0 ml
Σ	12,0 ml	18,0 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 12),

ki sprožita polimerizacijo. Ko vlijemo gel, počakamo 30 minut, da se deloma strdi, nato na vrhu dolijemo krovni gel (»Cover« gel), kateremu prej dodamo katalizatorja (Preglednica 12). Takoj, ko je krovni gel vlit, med plošči vstavimo glavnik. Na gel smo poleg vzorcev nanесли tudi standarde, ki so bili namenjeni kasnejši normalizaciji potovanja vzorcev med različnimi geli.

Preglednica 12: Količina dodanega katalizatorja za polimerizacijo gela in skupni končni volumni posameznih raztopin.

	APS (10 %)	TEMED	Σ
20 %	125,0 µl	5,2 µl	15,0 µl
60 %	125,0 µl	5,2 µl	15,0 µl
0 % krovni gel	50,0 µl	5,0 µl	5,00 µl

Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 minut v 1-kratni raztopini barvila SYBR Gold (SYBR[®] Gold nucleic acid gel stain, Invitrogen, USA) v 1× TAE pufru. Po barvanju smo gele spirali 1 minuto v 1x TAE. pH raztopine za barvanje in spiranje gelov je bil 7,6. Gele smo pregledovali s transiluminatorjem Gel Doc EQ System, PC (Bio-Rad, Italy) pod UV lučjo (302 nm). Za slikanje smo uporabili digitalni fotoaparat EOS 500D (Canon, Japonska).

3.4.7.5 Analiza DGGE profilov

Slike DGGE gelov (priloga B) smo uvozili v in DGGE profile analizirali s programskim paketom Bionumerics v6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgija). Nastavitve odstranjevanja šuma ozadja in ostalih шумov smo optimizirali s pomočjo funkcije »spectral analysis« za vsak gel posebej. Potovanje lis vzorcev v različnih gelih smo normalizirali s pomočjo standardnih vzorcev. Za detekcijo lis smo uporabili funkcijo avtomatskega iskanja »auto search bands« z nastavitvami »minimum profiling« 5% (relativne minimalne denzitometrične vrednosti za vključitev lis v nadaljnjo analizo) in »shoulder sensitivity« 2 (občutljivost algoritma za zaznavanje dveh zelo blizu ležečih lis). Zaznane lise smo pregledali in uvedli minimalne ročne popravke, npr. odstranitev lis, ki jih je program dodelil večjim prašnim delcem, drugim tujkom in artefaktom v gelih.

Nadalje smo izvedli analizo iskanja identičnih lis po vseh vzorcih (»band matching«), ki definira razrede lis glede na njihov relativen položaj v gelu izražen kot odstotek prepotovane

poti. Iskanje smo izvedli avtomatsko s pozicijsko toleranco 0,33%. Rezultate smo pregledali in dodelitev lis v razrede popravili ročno v skladu z navodili proizvajalca (Manual editing ..., 2009) zgolj in samo, če smo imeli utemeljen razlog, da je program dodelitev izpeljal napačno. Primer napake predstavljata lisi oz. skupini lis, ki sta sicer znotraj pozicijske tolerance 0,33%, vendar ju je program ločil v dva ločena razreda. Če nismo našli razloga za ločitev, smo lise združili v en sam razred. Napaka pa je možna tudi v obratni smeri, tj., da program lise, ki so izven 0,33% pozicijske tolerance ali na normalizirani sliki jasno ločene, vseeno združi v en sam razred. V takem primeru smo razred ločili na dva in lise dodelili glede na to kateremu razredu so bile bliže. Od skupaj 113 razredov lis, je bilo napačno definiranih in ročno popravljenih 7. Rezultate iskanja identičnih lis smo izvozili in del osnovnih statističnih analiz za vse vzorce skupaj in ločeno po tretmajih izvedli v programu Excel 2013 (Microsoft). Izračunali smo celokupno število različnih lis na tretma; povprečno število lis in standardni odklon na tretma; pogostost posameznega razreda lis izraženo kot delež vzorcev pri katerih se lisa pojavlja v odstotkih; in povprečno svetilnost razreda lis izraženo kot aritmetična sredina višine vrhov na denzitometričnih krivuljah.

V BioNumerics v6.1 (Applied maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgija) smo izvedli tudi analizo osnovnih komponent (PCA) in sicer v obliki analize ločevanja (»Discriminant analysis«) z upoštevanjem kvantitativnih vrednosti lis, saj nas je predvsem zanimalo, kako in če se definirane skupine (tretmaji) med seboj maksimalno ločijo in katere lise so za ločevanje tretmajev najbolj informativne.

3.5 ANALIZA METABOLNE AKTIVNOSTI EKTOMIKORIZNIH GLIV IN MICELIJA Z DVOFOTONSKIM KONFOKALNIM MIKROSKOPOM

Encimsko aktivnost ektomikoriznih gliv in micelija na sadikah bukve smo ugotavljali z dvofotonskim konfokalnim mikroskopom LSM 7 MP (Zeiss, Nemčija) v laboratoriju (referenčni center za konfokalno mikroskopijo Carl Zeiss) za nevroendokrinologijo in molekularno celično fiziologijo na Inštitutu za patološko medicino Medicinske fakultete.

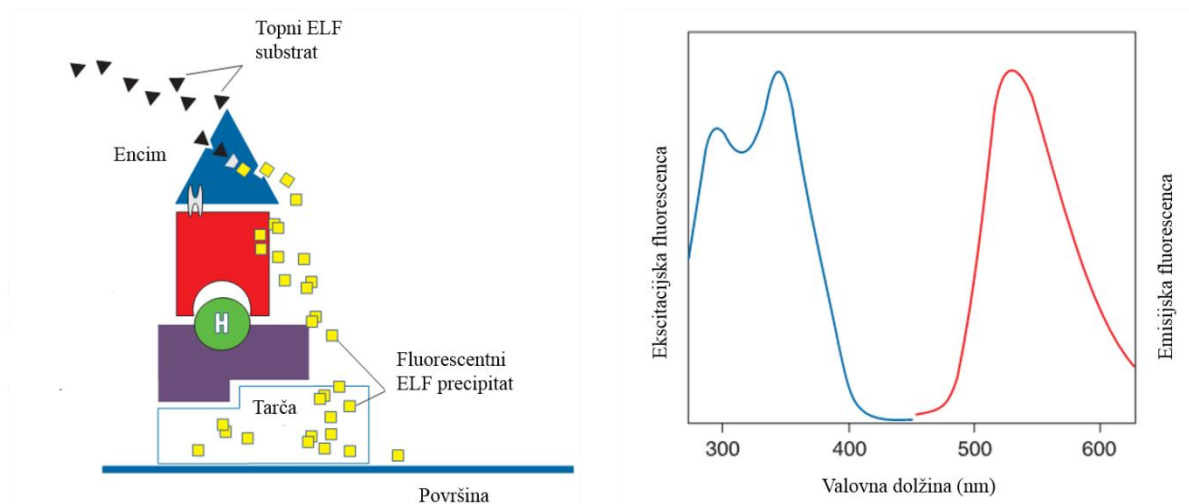
3.5.1 Vzorčenje in priprava vzorca za mikroskopiranje

Za mikroskopiranje smo pripravili sveže vzorce mikoriznih kratkih korenin. Vzorčili smo iz rizotronov. Za vsak eksploracijski tip smo izbrali po eno vrsto ektomikoriznih gliv iz poskusa: za CT ET vrsto iz rodu *Tuber*, za SD ET vrsto iz rodu *Hebeloma*, za MD ET vrsto iz rodu *Trichophaea* in za LD ET vrsto iz rodu *Scleroderma*. Za vpliv temperature na encimsko aktivnost smo vse analize naredili na vrsti *Scleroderma* sp. za vsak tretma. Mikorizne kratke korenine smo odrezali s škarjami in jih prenesli v petrijevke z destilirano vodo. S korenin smo s pomočjo čopiča odstranili substrat in jih pripravili za barvanje. Za vsak vzorec smo pripravili po tri mikorizne kratke korenine dolžine 3 do 4 mm.

Protokol za pripravo mikoriznih preparatov smo prilagodili po Alvarez in sod. (2004). Za pripravo preparata smo uporabili fosfatazni substrat ELF[®] 97 (Molecular Probes, Inc., USA) za barvanje in citrat fosfatni pufer za spiranje korenin po barvanju. Citrat fosfatni pufer smo pripravili z mešanjem 3,025 g/l Tris-(hidroksimetil)-aminometana, 2,9 g/l maleinske kisline, 3,5 g/l citronske kisline, 1,57 g/l borove kisline in 1M NaOH. Pufer smo s pomočjo 1M HCl umerili na pH 5. Raztopino ELF[®] 97 smo redčili s citrat fosfatnim pufrom v razmerju 10:2 v/v (pufer/ELF[®] 97)

3.5.2 Barvanje korenin z raztopino ELF[®] 97

Za vsak tip ektomikorize smo barvali po tri kratke korenine. Za analize encimske aktivnosti fosfataze pri glivah (Alvarez in sod., 2004, 2005, 2006, 2012) je v uporabi komercialni kit ELF[®] 97 (Johnson in Spence, 2010). Kit vsebuje topni substrat, ki ob prisotnosti delovanja fosfataze fluorescira. Prednost ELF[®] 97 je ta, da je razlika med vrhovoma ekscitacijske in emisijske valovne dolžino približno 200 nm, kar omogoča, da lahko signal, ki nastane kot posledica delovanja encimov, jasno ločimo od signala, ki nastane kot posledica avtofluorescence tkiva (Johnson in Spence, 2010).



Slika 8: Shematski prikaz delovanja ELF® 97 (levo) in emisijski ter ekscitacijski spekter ELF® 97 (desno) (Johnson in Spence, 2010: 162).

Očiščene mikorizne korenine smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in dodali 44 µl raztopine ELF® 97 (pH=5), 5x redčitev. Korenine smo barvali 15 minut, nato smo jih previdno prenesli v nove 1,5 µl mikrocentrifugirke, ter jih sprali s 100 µl citrat fosfatnega pufra (pH=5). Obarvane mikorizne korenine smo po spiranju prenesli na objektna stekelca s pufrom, na katera smo v obliki kroga nakapljali stopljen vosek v debelini mikoriznih korenin. Na korenine smo položili krovna stekelca in jih dodatno zalepili s stopljenim voskom vzdolž robov.

3.5.3 Mikroskopiranje z dvofotonskim konfokalnim mikroskopom LSM 7 MP (Zeiss, Nemčija)

Mikroskopiranje smo izvajali na Inštitutu za patofiziologijo v Ljubljani, v Laboratoriju za neuroendokrinologijo in molekularno celično fiziologijo (referenčni center za konfokalno mikroskopijo Carl Zeiss). Za mikroskopiranje smo uporabili dvofotonski konfokalni mikroskop LSM 7 MP (Zeiss, Nemčija), ki je bil nameščen v zatemnjenem prostoru na protivibracijski mizi, saj lahko mehanski tresljaji in svetloba motijo meritve. Slike za analize (Z-stack) smo zajemali s programsko opremo ZEN 2012 (black edition, Release version 8.0, © Carl Zeiss Microscopy GmbH 1997-2013), pri 20 x povečavi in vrednosti zoom 0,7 za eksploracijske tipe SD ET, MD ET in LD ET ter zoom 3,7 za CT ET. Razmik med rezinami je bil 10 µm. Za vsak vzorec smo opravili tri ponovitve meritev na treh različnih lokacijah.

3.5.4 Analiza slik

Slike smo analizirali s programom ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA). Za analizo smo slike najprej izvozili iz programa ZEN 2011 in jih shranili v formatu .tif. Pri slikah smo pred izvažanjem izklopili kanal z belo svetlobo, ker je sicer le-ta motil nadaljnje analize. Nato smo sliko odprli v programu ImageJ, jo razdelili na kanale in zaprli vse razen zelenega kanala. Iz originalne slike smo naredili dvojnike, na katerih smo nadaljevali z analizami.

Analiza originala:

1. S funkcijo *Poligon Selections* smo označili celotno površino mikorizne korenine oziroma hife, ki smo jo želeli analizirati.
2. Nato smo nadaljevali z nastavitvami: *Analyze → Set Scale...*, kjer smo pri prvi postavki *Distance in Pixels* vpisali 1 in *Set Measurements...*, kjer smo odključali *Limit to Threshold*.
3. Ko smo nastavili parametre, smo nadaljevali z meritvami: *Analyze → Measure*. Pojavilo se je okno z meritvami, ki smo jih prepisali v tabelo v MS Excel, ki smo jo pripravili sami. Prepisali smo podatke za *AREA* (Površina) in *MEAN* (Povprečna intenziteta fluorescence v konkretni sliki v plašču).
4. Po analizi originala smo nadaljevali z analizo na dvojnikih, kjer smo merili vrednosti pri pragu 10 %.

Analiza dvojnika

5. Preden smo začeli z analizo, smo postavili prag: *Image → Adjust → Threshold...*
6. Nato smo kopirali označeno površino iz originalne slike na dvojnik: *CTRL+C → Edit → Selection → Restore Selection*.
7. Sledile so nastavitve za analize: *Analyze → Set Scale... → Distance in Pixels = 1, Set Measurements...*, kjer smo obkljukali *Limit to Threshold*
8. Pri opravljenih meritvah smo prepisali le vrednost za *AREA* (Površina): *Analyze → Measure...*
9. Nato smo nadaljevali z analizo na naslednjem dvojniku pri drugem pragu.

Statistične analize encimske aktivnosti pri pragu 10 % smo naredili v programu Microsoft Excel 2013 in Statistica 10.0 (StatSoft Inc.). Podatke smo transformirali in izbrali neparametrični test (Kruskal-Wallis test).

3.6 ANALIZE VSEBNOSTI IZOTOPOV $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$ Z UPORABO MASNEGA SPEKTROMETRA ZA STABILNE IZOROPE

Analize stabilnih izotopov ogljika in dušika v vzorcih listov, stebel, korenin in mikorize smo naredili na Thermo-Scientific Delta v laboratorijih na Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung v Nemčiji pri dr. Zachary Kayler-ju. V advantage masnem spektrometru za stabilne isotope (IRMS, *ang. isotope-ratio mass spectrometry*), ki je povezan z elementnim analizatorjem Thermo Finnigan Flash HT. Vzorce smo najprej zatehtali v kositrne kapsule, zabeležili zatehtane količine in jih vstavili v nosilec. V elementnem analizatorju se vzorec sežge pri temperaturi 650 °C, pri čemer se ogljik pretvori v CO₂, dušik pa v N₂. Nastala plina z nosilnim plinom (helij) preko razredčevalca plinov Conflow IV potujeta do masnega spektrometra. Za zagotavljanje QA/QC analiznega postopka smo uporabili laboratorijske standarde (Ulva, acetanilid (Merck), Apple leave, Coffeine, High organic matter, Low organic matter, Beet, Annu) ki so bili umerjeni na mednarodne certificirane referenčne materiale (IAEA-CH-6, USGS40 in IAEA-N-1). Rezultati so podani z delta (δ) notacijo v promilih (‰) glede na VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) za ogljik in AIR (zrak) za dušik. Točnost rezultatov je v območju $\pm 0.1\%$.

4 REZULTATI

4.1 NEDESTRUKTIVNA ANALIZA KORENINSKEGA SISTEMA S PROGRAMOM ROOTFLY[®]

Z nedestruktivnimi analizami korenin smo ugotovili značilne razlike v dolžini korenin med letom 2010 in 2011 pri tretmaju v klimatizirani komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) in v rastlinjaku (GH). Pri povprečnem premeru korenin nismo opazili značilnih razlik.

Dolžina korenin se je pri vseh štirih tretmajih povečala, kot smo pričakovali, vendar je statistično značilna razlika ($p < 0,01$) v dolžini korenin med letoma 2010 in 2011 opazna le pri sadikah z dodatno hlajenim koreninskim sistemom (CR+) in pri sadikah iz rastlinjaka (GH). Sadike v klimatizirani komori (CR+, CR-) so imele v letu 2011 najbolj razvit koreninski sistem, sledile so sadike v rastlinjaku (GH), najslabše razvit koreninski sistem pa smo opazili pri sadikah, ki so rastle zunaj (OUT) (Preglednica 13).

Pri meritvah vprečnega premera korenin nismo pazili statistično značilnih razlik (Preglednica 13).

Preglednica 13: Rezultati nedestruktivne analize korenin. Skupna dolžina korenin (mm) in povprečni premer korenin (mm) pri sadikah bukve.

Tretma		p	dolžina (mm)		p	povprečni premer (mm)	
			2010	2011		2010	2011
Klimatizirana komora	(CR+)	p<0,001	1884,58 (n=16)	9593,16 (n=17)	0,08	0,68±0,17 (n=16)	0,51±0,04 (n=17)
	(CR-)	0.72	4200,04 (n=16)	5078,41 (n=15)	0,05	0,70±0,14 (n=16)	0,53±0,09 (n=15)
Rastlinjak	(GH)	p<0,01	621,71 (n=13)	1922,23 (n=14)	1,00	0,49±0,12 (n=13)	0,44±0,04 (n=14)
Zunaj (OUT)		1.00	630,10 (n=10)	716,64 (n=10)	1.00	0,48±0,07 (n=10)	0,49±0,06 (n=10)

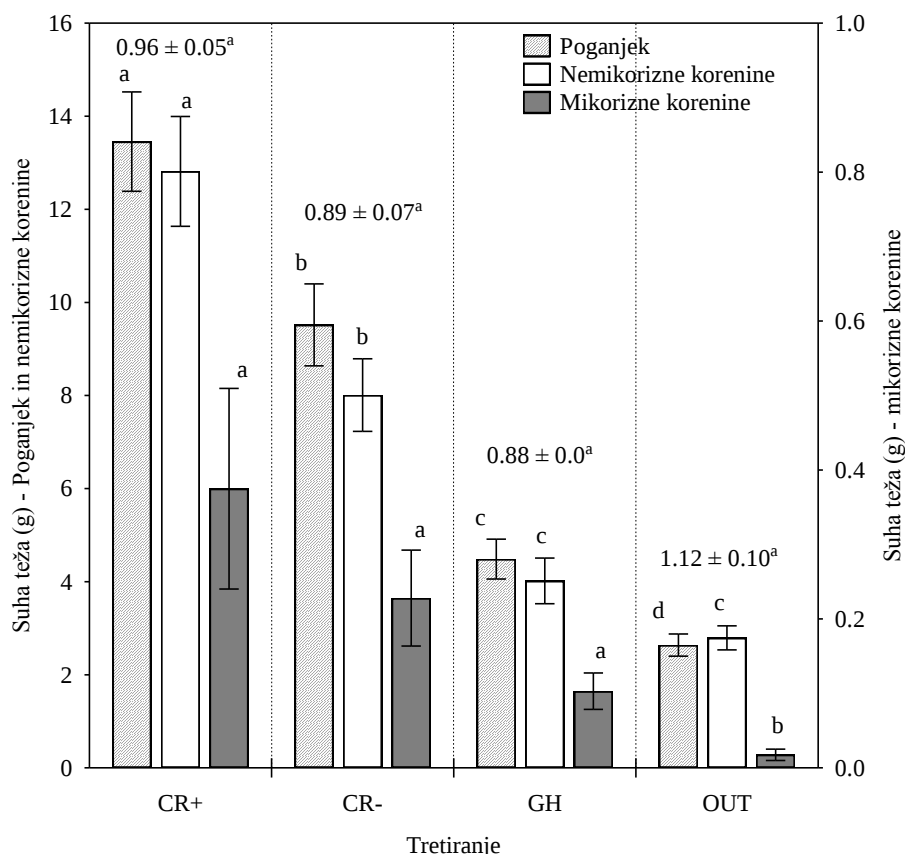
4.2 DESTRUKTIVNA ANALIZA SADIK BUKVE IN SUBSTRATA

4.2.1 Analiza nadzemnega dela sadik bukve

Pri celotnem tretmaju nismo zabeležili statističnih razlik za višino sadik (Preglednica 14) in za razmerje med nadzemnim in podzemnim delom sadik (Slika 9). Kljub temu je bila višina sadik, ki so rastle zunaj (OUT) v primerjavi s sadikami iz ostalih tretmajev precej nizka in razmerje med podzemnim in nadzemnim delom neznačilno visoko. Rastne razmere so najbolj izrazito vplivale na biomaso nadzemnega dela, ki je bila nižja pri sadikah z nehlajenim koreninskim sistemom (CR-) v primerjavi s hlajenim (CR+). Še nižjo biomaso nadzemnega dela smo zabeležili pri sadikah iz rastlinjaka (GH) in sadikah, ki so rastle zunaj (OUT) (Slika 9). Podobne rezultate smo zabeležili za biomaso korenin (Slika 9) in premer stebela (Preglednica 14). Sadike, ki so rastle zunaj (OUT) so dosegle najvišjo višino glede na najnižjo biomaso. Pri sadikah, ki so rastle v klimatizirani sobi (CR+ in CR-) nismo zabeležili statistično značilnih razlik v biomasi mikoriznih korenin, enako velja za sadike iz rastlinjaka, medtem ko je bila biomasa mikoriznih korenin sadik, ki so rastle zunaj, značilno nizka (Slika 9).

Preglednica 14: Značilnosti poganjkov in listov pri sadikah bukve, ki so rastle pri različnih rastnih razmerah (povprečje ± SE). Značilne razlike so zabeležene pri $p < 0,05$ in so označene z različnimi črkami. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; SLA: specifična listna površina, LAR: razmerje listne površine. n: število sadik.

	p	CR+	CR-	GH	OUT
Poganjki					
Višina poganjkov (cm)	0.06	54.9±3.6 a	55.0±4.4 a	49.4±2.1 a	42.0±2.3 a
Premer stebela(mm)	<0.001	6.44±0.20 c	5.52±0.21 b	4.03±0.20 a	3.51±0.21 a
Listi					
Listna površina (cm ²)	<0.001	458±41 b	452±40 b	305±49 a	249±36 a
Suha masa listov (g)	<0.001	1.77±0.18 b	1.66±0.16 b	0.90±0.14 a	0.58±0.09 a
Št. listov	<0.001	65±6 b	72±7 b	29±5 a	20±3 a
SLA (m ² kg ⁻¹)	<0.001	25.8±1.0 a	26.7±0.9 a	31.8±0.7 b	39.9±0.86 c
LAR (m ² kg ⁻¹)	<0.001	18.2±1.4 a	26.0±1.9 ab	33.4±3.3 b	42.2±4.1 b
n		17	15	17	14



Slika 9: Suha masa nemikoriznih korenin in poganjkov (levo) in mikoriznih korenin (desno) (povprečje ± SE) triletnih sadik bukve, ki so rastle pri različnih temperaturnih razmerah. Značilne razlike ($p < 0,005$) so označene z različnimi črkami. Nad stolpci je prikazano povprečje razmerja med koreninami in poganjki ($p = 0,08$). CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin ($n = 17$). CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin ($n = 15$), GH: rastlinjak ($n = 17$), OUT: zunaj ($n = 14$).

Temperatura tal ne vpliva na značilnosti listov (površina listov, število listov in biomasa listov) pri sadikah, saj pri sadikah, ki so rastle v klimatizirani komori, za omenjene parametre nismo zabeležili statistično značilnih razlik (Preglednica 14). Kljub temu pa so bili omenjeni parametri značilno različni v primerjavi s sadikami, ki so rastle v rastlinjaku in zunaj, medtem ko med obema tretmajema prav tako nismo zabeležili značilnih razlik. Specifična površina listov (SLA) je bila največja pri sadikah, ki so rastle zunaj, manjša pri sadikah iz rastlinjaka in najmanjša pri sadikah iz klimatizirane komore (Preglednica 14). Podobne rezultate smo opazili za razmerje listne površine (LAR) (Preglednica 14).

4.2.2 Analiza koreninskega sistema s programom WinRhizo®

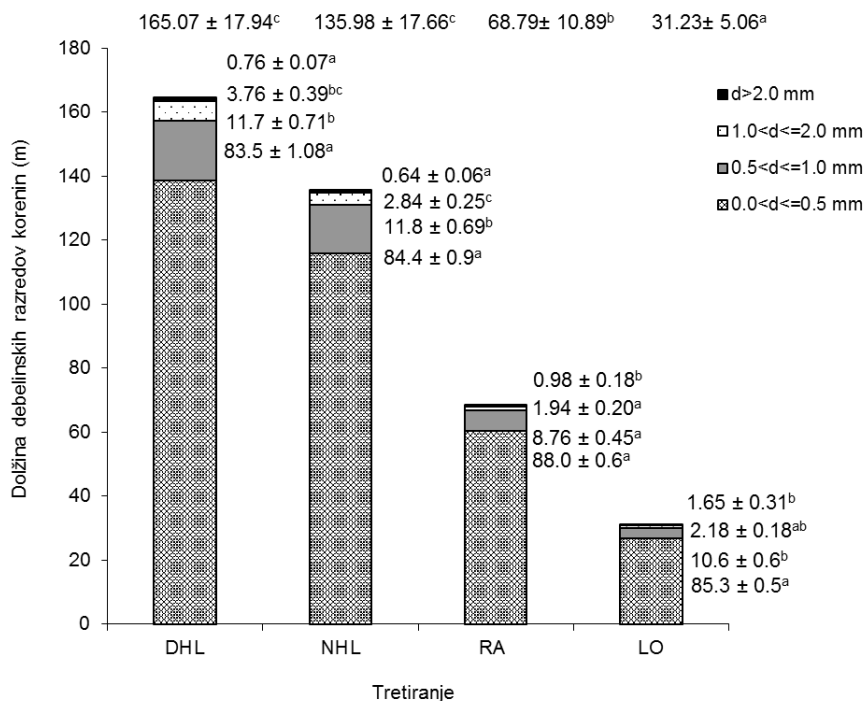
Z destruktivno analizo koreninskega sistema smo ugotovili, da so najdaljši koreninski sistem razvile sadike v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (CR+), sledile so sadike brez dodatnega hlajenja korenin (CR-), tretma v rastlinjaku (GH) in tretma zunaj (OUT) z najkrajšo dolžino koreninskega sistema. Tretmaja v klimatizirani komori sta se značilno razlikovala glede na specifično dolžino korenin (SRL). Tretma v rastlinjaku se je značilno razlikoval od ostalih tretmajev glede na gostoto koreninskih vršičkov, medtem ko je bil glede na specifično gostoto koreninskih vršičkov podoben tretmaju CR-. Pri sadikah zunaj smo opazili najmanjše število razvejitev korenin, medtem ko je bila gostota razvejitev najmanjša pri tretmaju CR+.

Sadике iz klimatizirane komore so razvile najdaljši koreninski sistem (Slika 10) in temu ustrezno smo pri njih zabeležili največje število koreninskih vršičkov in razvejitev (Preglednica 15). Sadike brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) so razvile skoraj enako dolžino korenin, kot sadike z dodatnim hlajenjem koreninskega predela (CR+), sledile so sadike iz rastlinjaka (GH), najmanjšo dolžino koreninskega sistema pa so razvile sadike, ki so rastle zunaj (OUT) (

Slika 10). Sadike z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) so imele statistično značilno manjšo specifično dolžino korenin (SRL) v primerjavi s sadikami brez dodatnega hlajenja korenin (CR-), kar lahko povežemo z vplivom temperature tal. Povečan SRL smo zabeležili tudi pri sadikah iz rastlinjaka (GH) (Preglednica 15) glede na sadike CR+. Povprečni premer nemikoriznih korenin sadik brez dodatnega hlajenja (CR-) je bil manjši v primerjavi s sadikami z dodatnim hlajenjem (CR+) (Preglednica 15), medtem ko je bil delež drobnih korenin (0-0,5 mm) večji (

Slika 10). Vendar razlike med obema omenjenima parametroma pri obeh skupinah sadik, ki so rastle v klimatizirani komori, niso statistično značilne. Prav tako nismo opazili statistično značilnih razlik pri deležu koreninskih razredov. Sadike, ki so rastle v rastlinjaku (GH) imajo največji delež drobnih korenin, več kot 98 % (

Slika 10) in najmanjši povprečni premer korenin (Preglednica 15). Poleg tega smo pri sadikah iz rastlinjaka (GH) opazili največjo gostoto koreninskih vršičkov (Preglednica 15), medtem ko je gostota razvejitev primerljiva s sadikami, ki so rastle zunaj (OUT), specifična gostota koreninskih vršičkov pa s sadikami iz klimatizirane komore, brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) (Preglednica 15).



Slika 10: Dolžina debelinskih razredov tri letnih sadik, ki so rastle pri različnih razmerah. Korenine so razdeljene v razrede glede na premer (d). Poleg stolpcev je zapisan delež koreninskih razredov (povprečna vrednost ± SE), ki je preračunan na skupno dolžino korenin. Nad stolpci je zapisana skupna dolžina korenin (m) (povprečna vrednost ± SE) za posamezni tretma. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) so označene z različnimi črkami. CR+: hladna soba, dodatno hlajenje korenin (n=17), CR-: hladna soba, brez dodatnega hlajenja korenin (n=15), GH: rastlinjak (n=17), OUT: zunaj (n=14).

Preglednica 15: Značilnosti korenin tri letnih sadik bukve, ki so rastle pri različnih razmerah (povprečna vrednost ± SE). Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) so označene z različnimi črkami. CR+: hladna soba, dodatno hlajenje korenin, CR-: hladna soba, brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; SRL: specifična dolžina korenin.

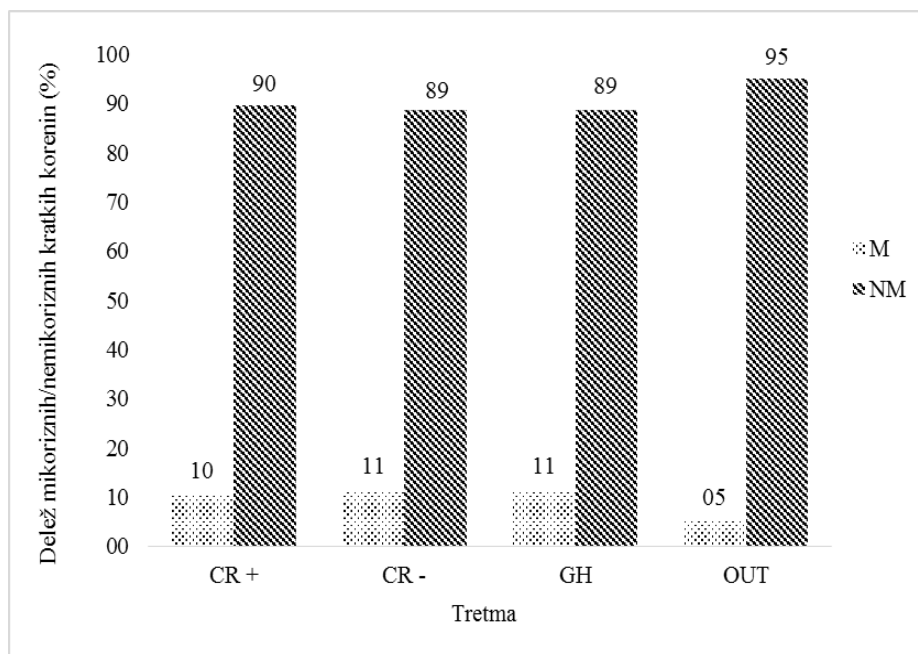
	p	CR+	CR-	GH	OUT
Premer nemikoriznih korenin (mm)	<0.01	0.39±0.01 b	0.36±0.01 ab	0.34±0.01 a	0.40±0.01 bc
Št. kor. vršičkov x 10 ³	<0.001	52.5±5.8 c	42.9±4.8 c	24.2±4.0 b	9.9±1.5 a
SRL (m g ⁻¹)	<0.05	12.6±0.8 ab	16.8±1.3 c	16.1±1.5 bc	10.3±1.0 a
Gostota kor. vršičkov (cm ⁻¹)	0.02	3.21±0.06 a	3.32±0.10 a	3.53±0.07 b	3.31±0.07 a
Specifična gostota kor. vršičkov (g ⁻¹)	<0.001	4044±296 a	5496±451 b	5598±512 b	3300±296 a
Št. razvejitev x 10 ³	<0.001	100±13 c	80.4±9.9 c	47.9±8.3 b	19.7±3.1 a
Gostota razvejitev cm ⁻¹	<0.01	5.81±0.21 a	6.02±0.17 ac	6.79±0.23 b	6.44±0.22 bc
n		17	15	17	14

4.2.3 Delež mikoriznih in nemikoriznih korenin v poskusu

Največ ektomikoriznih kratkih korenin (k.k.) je bilo pri sadikah v tretmaju v rastlinjaku (GH) (11,4 %), sledile so sadike v klimatizirani komori brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) (11,3 %), sadike iz hladne komore z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (10,3 %) in sadike, ki so rastle zunaj (OUT) (5,0 %). Delež nemikoriznih kratkih korenin pri tretmaju (OUT) zunaj je bil 95,0 %, v klimatizirani komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) 89,7 %, brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) 88,7 % in v rastlinjaku (GH) 88,6 % (Preglednica 16, Slika 11).

Preglednica 16: Delež mikoriznih in nemikoriznih korenin v posameznem tretmaju.

	Št. korenin	CR +	CR -	GH	OUT
vitalne mikorizne korenine	n	94327	74419	49424	8790
nemikorizne korenine	n	819973	586917	383826	168385
skupaj vseh korenin	n	914300	661336	433250	177175
delež mikoriznih korenin	%	10.3	11.3	11.4	5
delež nemikoriznih korenin	%	89.7	88.7	88.6	95



Slika 11: Delež mikoriznih in nemikoriznih kratkih korenin v tretmaju (%). Nad stolpci so zapisani deleži (%). CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj

4.2.4 Identifikacija ektomikoriznih gliv na sadikah bukve

Z analizami ektomikoriznih gliv na sadikah bukve smo dokazali, da je kombinacija različnih metod nujno potrebna za učinkovito identifikacijo ECM gliv do rodu ali vrste. Z anatomsko-morfološko metodo (Agerer, 1987-2008) smo opisali 123 tipov ektomikoriznih (ECM) gliv, od tega smo uspešno identificirali le tri različne rodove, medtem ko je 83 ECM tipov ostalo neidentificiranih. Eno vrsto, *Cenococcum geophilum* Fr., smo uspešno identificirali do vrste. Nadaljevali smo z molekulskimi metodami identifikacije. V sekvenciranje smo poslali 129 vzorcev DNA in do rodu udpešno identificirali 114 ECM tipov, ki so pripadale šestim različnim rodovom. Filogenetske analize smo naredili le za štiri rodove in sicer za vrste iz rodu *Scleroderma* sp., *Tuber* sp., *Peziza* sp. in *Hebeloma* sp. Do vrste smo uspešno identificirali vrsti *Peziza ostracoderma* K. in *Hebeloma mesophaeum* (P.)

4.2.4.1 Anatomsko-morfološka analiza po (Agerer, 1987-2008)

Po destruktivni analizi smo s pomočjo lupe in mikroskopa pregledali koreninski sistem vseh 68 sadik bukve. Skupno smo po anatomsko-morfoloških značilnostih (Agerer, 1987-2008) opisali 123 tipov ECM, od tega smo 35-krat identificirali vrste iz rodu *Scleroderma* sp., 4-krat vrste iz rodu *Tuber* sp. in 1-krat vrsto iz rodu *Cenococcum* sp. Ostalih 83 ektomikoriznih tipov nismo uspeli identificirati do rodu z anatomsko-morfološko metodo zato smo nadaljevali z molekulskimi metodami identifikacije. Pri sadikah bukve, ki so rastle v klimatizirani komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) smo opisali 51 tipov ektomikorize (ECM), od teh smo do rodu uspešno identificirali glive iz rodu *Scleroderma* sp. (14-krat) in *Tuber* sp. (3-krat). Pri sadikah bukve, ki so prav tako rastle v klimatizirani komori, vendar brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) smo opisali 43 tipov ECM, od teh smo uspešno identificirali vrste iz rodu *Scleroderma* sp. (10-krat), *Cenococcum* sp. (1-krat) in *Tuber* sp. (1-krat). Pri sadikah bukve iz rastlinjaka (GH) smo opisali 18 tipov ECM, do rodu smo uspešno identificirali vrste iz rodu *Scleroderma* sp. (10-krat), medtem ko smo pri sadikah, ki so rastle zunaj (OUT) opisali 11 tipov ECM, od tega smo do rodu uspešno identificirali vrsto iz rodu *Scleroderma* sp. (1-krat). Omenjene vrste smo pri sadikah bukve identificirali tudi v diplomskem delu (Štraus, 2010).

4.2.4.2 Molekulska analiza

Nadaljevali smo z molekulskimi analizami nukleotidnih zaporedij, sekvenciranjem in analizo v programu FinchTV 1.4. Pregledana nukleotidna zaporedja smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi podatkov GenBank s programom BLASTn. Skupaj smo v sekvenciranje poslali 129 vzorcev DNA. Dodatnih 6 vzorcev (od 123 vzorcev ECM identificiranih z anatomsko-morfološko metodo) je posledica dvojnih lis na gelu pri določenih mikoriznih vzorcih, ki smo jih prav tako izrezali in sekvencirali. V vseh tretmajih skupaj smo do rodu uspešno identificirali 114 tipov ECM gliv, od tega 34-krat vrste iz rodu *Scleroderma*, 56-krat vrste iz rodu *Tuber*, 9-krat vrste iz rodu *Pulvinula*, 13-krat vrste iz rodu *Trichophaea*, 1-krat vrsto iz rodu *Peziza* in 1-krat vrsto iz rodu *Hebeloma*. Iz tretmaja v klimatizirani komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) smo v sekvenciranje poslali 54 nukleotidnih zaporedij, od tega smo jih 48 uspešno določili do rodu (14-krat *Scleroderma* sp., 27-krat *Tuber* sp., 4-krat *Pulvinula* sp., 3-krat *Trichophaea* sp, 1-krat *Hebeloma* sp.), dve nukleotidni zaporedji sta bili neberljivi in štiri so po podobnosti najbolj sorodne neidentificiranim vrstam iz okolja. Iz tretmaja v klimatizirani komori brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) smo v sekvenciranje poslali 44 nukleotidnih zaporedij, od tega smo jih do rodu uspešno identificirali 38 (8-krat *Scleroderma* sp., 16-krat *Tuber* sp., 4-krat *Pulvinula* sp., 10-krat *Trichophaea* sp.), eno nukleotidno zaporedje je bilo neberljivo, pet pa jih je bilo najbolj podobnih neidentificiranim vrstam iz okolja. Iz tretmaja v rastlinjaku (GH) smo v sekvenciranje poslali 18 nukleotidnih zaporedij, od tega smo jih 17 uspešno identificirali (10-krat *Scleroderma* sp., 6-krat *Tuber* sp., 1-krat *Pulvinula* sp.), eno nukleotidno zaporedje pa je bilo po podobnosti nukleotidnega zaporedja najbolj podobno neidentificiranim vrstam iz okolja. Iz tretmaja, ki je bil zastavljen zunaj (OUT) smo v sekvenciranje poslali 13 nukleotidnih zaporedij, od tega smo jih 10 uspešno identificirali do rodu (2-krat *Scleroderma* sp., 7-krat *Tuber* sp., 1-krat *Peziza* sp.), dve nukleotidni zaporedji sta bili neberljivi in eno je bilo po podobnosti nukleotidnega zaporedja najbolj podobno neidentificirani vrsti iz okolja.

Vrste iz rodu *Scleroderma* sp., *Tuber* sp., *Hebeloma* sp., *Peziza* sp. in *Cenococcum* sp. smo pri sadikah bukve v temperaturnem poskusu uspešno identificirali tudi v okviru diplomske naloge (Štraus, 2010).

4.2.4.3 Filogenetska analiza

Po molekulski analizi smo nadaljevali s filogenetskimi analizami za nukleotidna zaporedja iz rodov *Scleroderma* sp. (Slika 13), *Tuber* sp. (Slika 15), *Peziza* sp. (Slika 17) in *Hebeloma* sp. (Slika 19). Nukleotidna zaporedja vzorcev iz rodu *Scleroderma* sp. se v filogenetskem drevesu uvrstijo v skupino (grozd) vrste *Scleroderma areolatum*. Ker sta v skupini vrste *S. areolatum* tudi dve nukleotidni zaporedji *S. verrucosum*, ne moremo zagotovo trditi, kateri vrsti pripadajo nukleotidna zaporedja iz tretmaja. Podobno velja za nukleotidna zaporedja iz rodu *Tuber* sp., ki se v filogenetskem drevesu uvrstijo ločeno v skupino (grozd), ki filogenetsko sodi v skupino t.i. malih belih gomoljik, ki so v bazi podatkov GenBank in UNITE zastopane pretežno z vrstno neklasificirani vzorci iz rodu *Tuber*. Nukleotidno zaporedje iz rodu *Peziza* se po filogenetski analizi uvrsti v skupino (grozd) vrste *Peziza ostracoderma*, nukleotidno zaporedje iz rodu *Hebeloma* pa se uvrsti v skupino vrste *Hebeloma mesophaeum*. Nukleotidna zaporedja iz rodu *Pulvinula* se ne poravnajo z nukleotidnimi zaporedji iz spletnih baz (GenBank in UNITE), oziroma so si po podobnosti najbolj podobne različnim vrstam oziroma rodovom, zato jih nismo vključili v filogenetske analize. Prav tako smo iz filogenetskih analiz izključili nukleotidna zaporedja za rod *Trichophaea*, ker jih v spletnih bazah (GenBank in UNITE) ni bilo dovolj za primerjavo in *Cenococcum* sp., za katerega zaradi premalo vzorca nismo delali molekulskih analiz.

4.2.5 Kratki opisi tipov ektomikoriznih gliv

Kratke opise tipov ECM gliv smo naredili za vrste iz rodov, ki smo jih vključili v filogenetske analize (*Scleroderma* sp., *Tuber* sp., *Hebeloma* sp. *Peziza* sp.) in za vrste, ki smo jih z molekulskimi analizami (*Pulvinula* sp., *Trichophaea* sp.) in anatomsko-morfološkimi (*Cenococcum* sp.) določili do rodu.

4.2.5.1.1 *Scleroderma* sp.

Morfologija mikoriznega sistema:

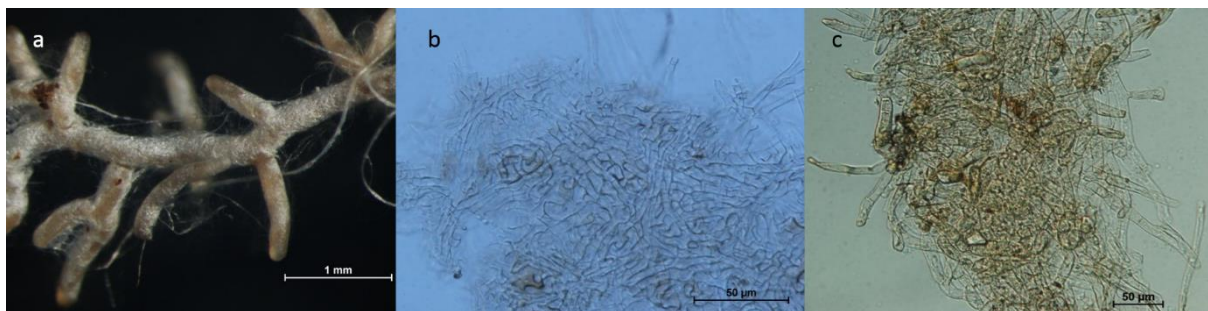
Razraščanje:	monopodialno piramidalno
Oblika:	ravna do rahlo ukrivljena
Površina:	gladka, pod površino plašča je ujet zrak
Dolžina:	do 20 mm
Premer osi:	do 1 mm
Obarvanost plašča:	bleščeče bela zaradi zraka ujetega v preplet hif, starejši deli oker do rjavi (zraka med hifami ni več)
Obarvanost apeksa:	bela
Izhajajoči elementi:	hife in rizomorfi
Eksploracijski tip:	eksploracijski tip na dolge razdalje (LD ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

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

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	Hife so zelo pogoste, nimajo zaponk. Povezave med hifami so tipa b ₂ (Agerer, 1987-2008). Opazili smo posamezne zožitve in odebelitve 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 (Agerer, 1987-2008)
Cistidiji:	niso prisotni



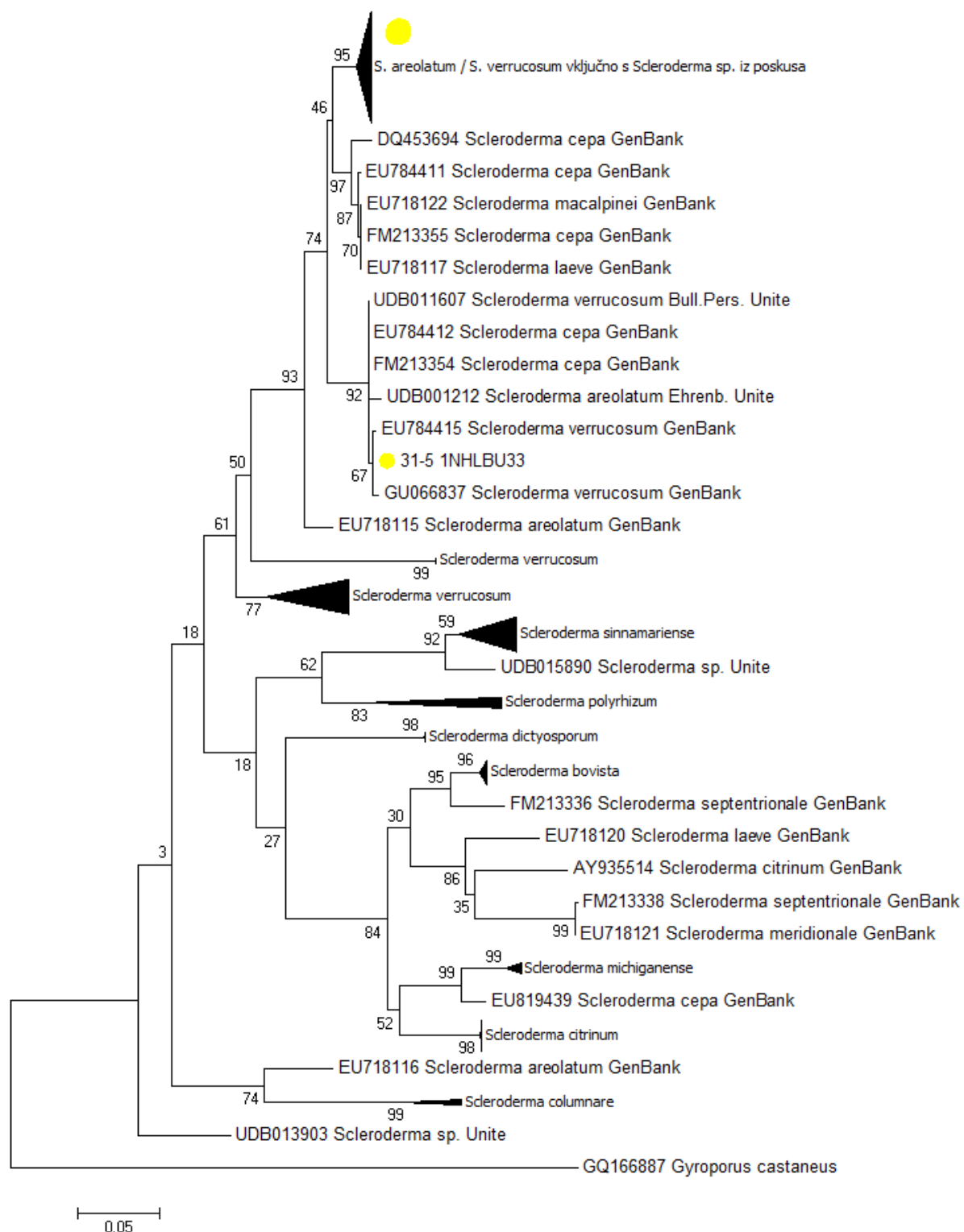
Slika 12: a - Ektomikorizna gliva iz rodu *Scleroderma* sp., b – plektenhimatski plašč, c - odebeljene hife

Molekulske analize:

Nukleotidna zaporedja vzorcev so bila po primerjavi z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi Genbank najbolj podobna vrstam iz rodu *Scleroderma*, in sicer *S. areolatum* in *S. verrucosum*.

Filogenetske analize:

Parametre za filogenetsko drevo taksonomske enote *Scleroderma* smo izračunali s programom MEGA[®] 6.0 (Tamura in sod., 2013) z izborom modela (T92: Tamura-3-parametrični model) nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi Maximum Likelihood (2000 Bootstrap). Ker se vrste iz poskusa uvrščajo v nehomogeno skupino vrst iz rodu *Scleroderma* zbranih iz spletnih baz, na podlagi filogenetskih analiz ne moremo sklepati o vrsti.



Slika 13: Filogenetsko drevo taksonomske enote *Scleroderma*, konstruiran po metodi Maximum likelihood (2000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumenimi pikami so označeni vzorci iz našega poskusa.

4.2.5.1.2 *Tuber* sp.

Morfologija mikoriznega sistema:

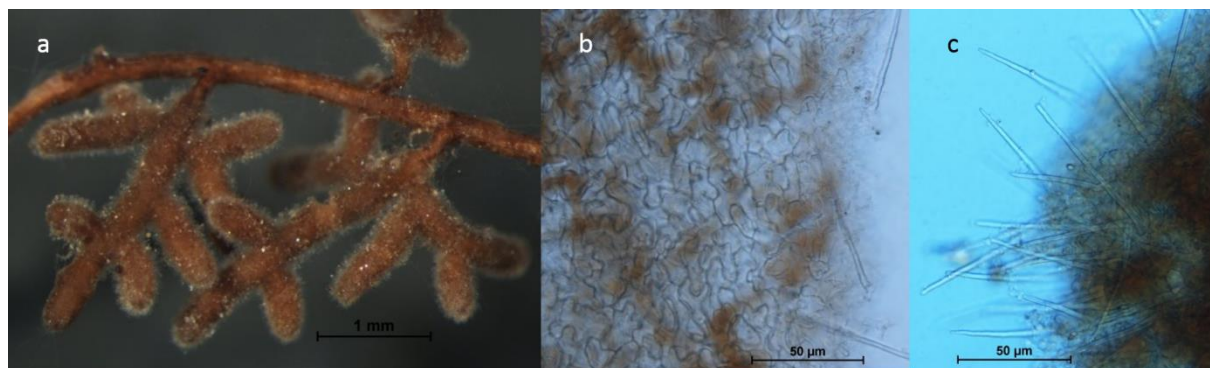
Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna
Površina:	gladka
Dolžina:	do 10 mm
Premer osi:	do 2,5 mm
Obarvanost plašča:	rjava
Obarvanost apeksa:	rjava
Izhajajoči elementi:	cistidiji
Eksploracijski tip:	kontaktni eksploracijski tip (CT ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

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

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	niso prisotne
Rizomorfi:	niso prisotni
Cistidiji:	ježasto izraščajo iz mikoriznega plašča, tip A po Agerer (1987-2008)



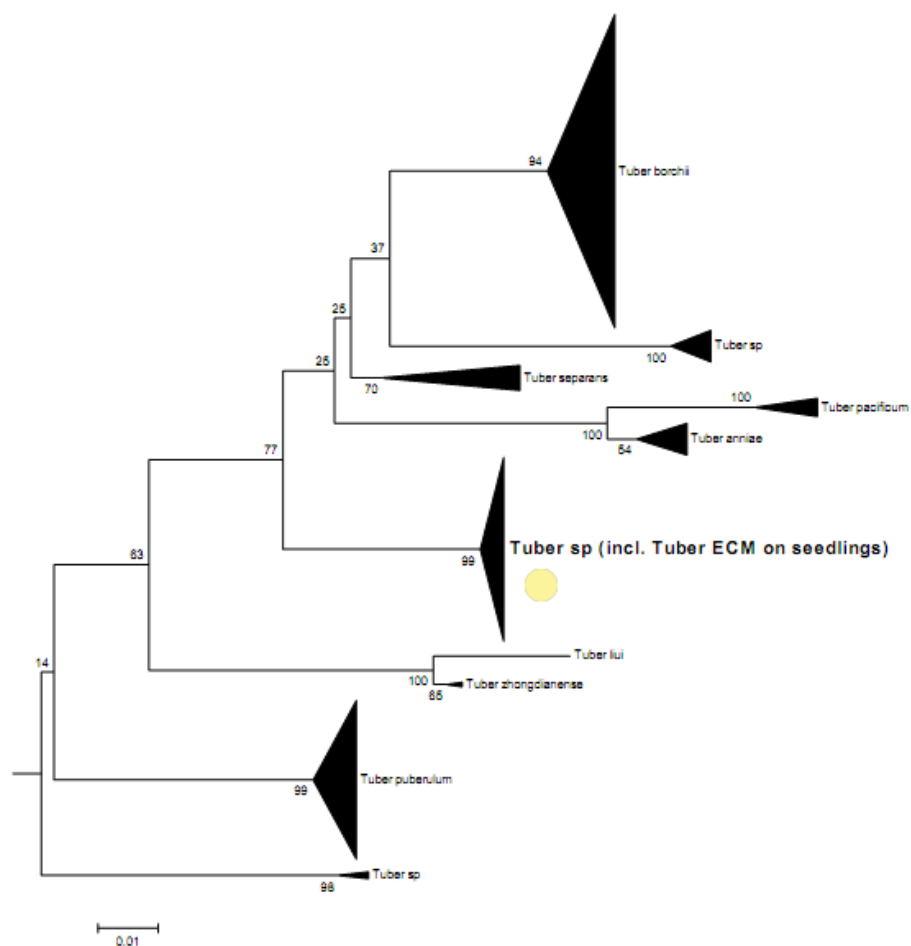
Slika 14: a-ektomikorizna gliva iz rodu *Tuber*, b-pseudoparenhimatski plašč tipa M, c-cistidiji tipa A

Molekulske analize:

Nukleotidna zaporedja vzorcev so bila po primerjavi z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi Genbank najbolj podobna vrstam iz rodu *Tuber*. Z molekulskimi analizami nukleotidnih zaporedij nismo uspeli določiti vrst ektomikoriznih gliv.

Filogenetske analize:

Parametre za filogenetsko drevo taksonomske enote *Tuber* smo izračunali s programom MEGA[®] 5.0 (Tamura in sod., 2011) z izborom modela (T92: Tamura-3-parametrični model) nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi Maximum Likelihood (1000 Bootstrap). Za rod *Tuber* na podlagi filogenetskega drevesa ne moremo sklepati za katero vrsto gre, saj vzorci tvorijo ločeno grozd, ki filogenetsko sodi v skupino malih belih gomoljik, ki so v bazi podatkov GenBank zastopane pretežno z vrstno neklasificiranimi vzorci iz rodu *Tuber*.



Slika 15: Filogenetsko drevo taksonomske enote *Tuber*, konstruiran po metodi Maximum likelihood (1000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumeno piko so označeni vzorci iz našega poskusa.

4.2.5.2 *Peziza ostracoderma* K.

Morfologija mikoriznega sistema:

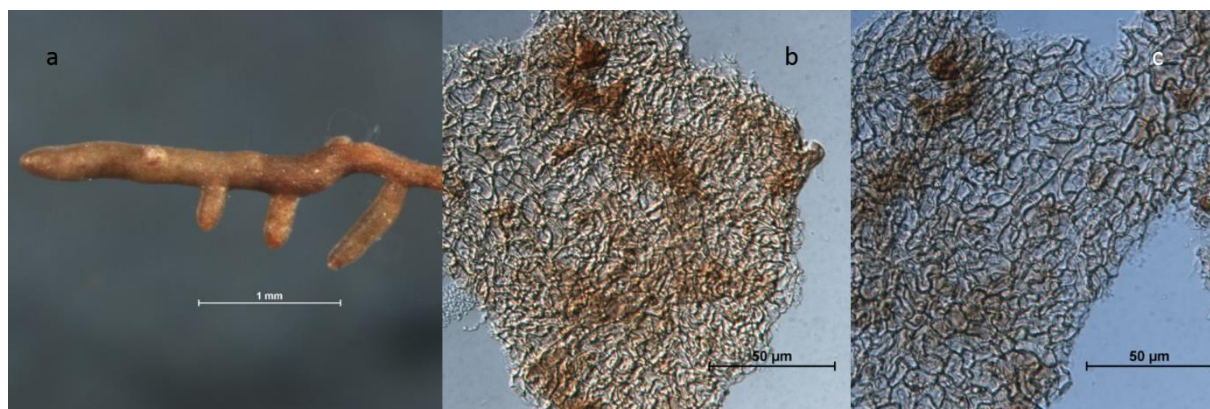
Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna
Površina:	gladka
Dolžina:	do 20 mm
Premer osi:	do 0,25 mm
Obarvanost plašča:	oker
Obarvanost apeksa:	oker
Izhajajoči elementi:	nismo opazili
Eksploracijski tip:	Eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

Zunanji sloj:	parenhimatski plašč po (Agerer, 1987-2008)
Notranji sloj:	parenhimatski plašč po (Agerer, 1987-2008)

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	zelo redke
Rizomorfi:	niso prisotni
Cistidiji:	niso prisotni



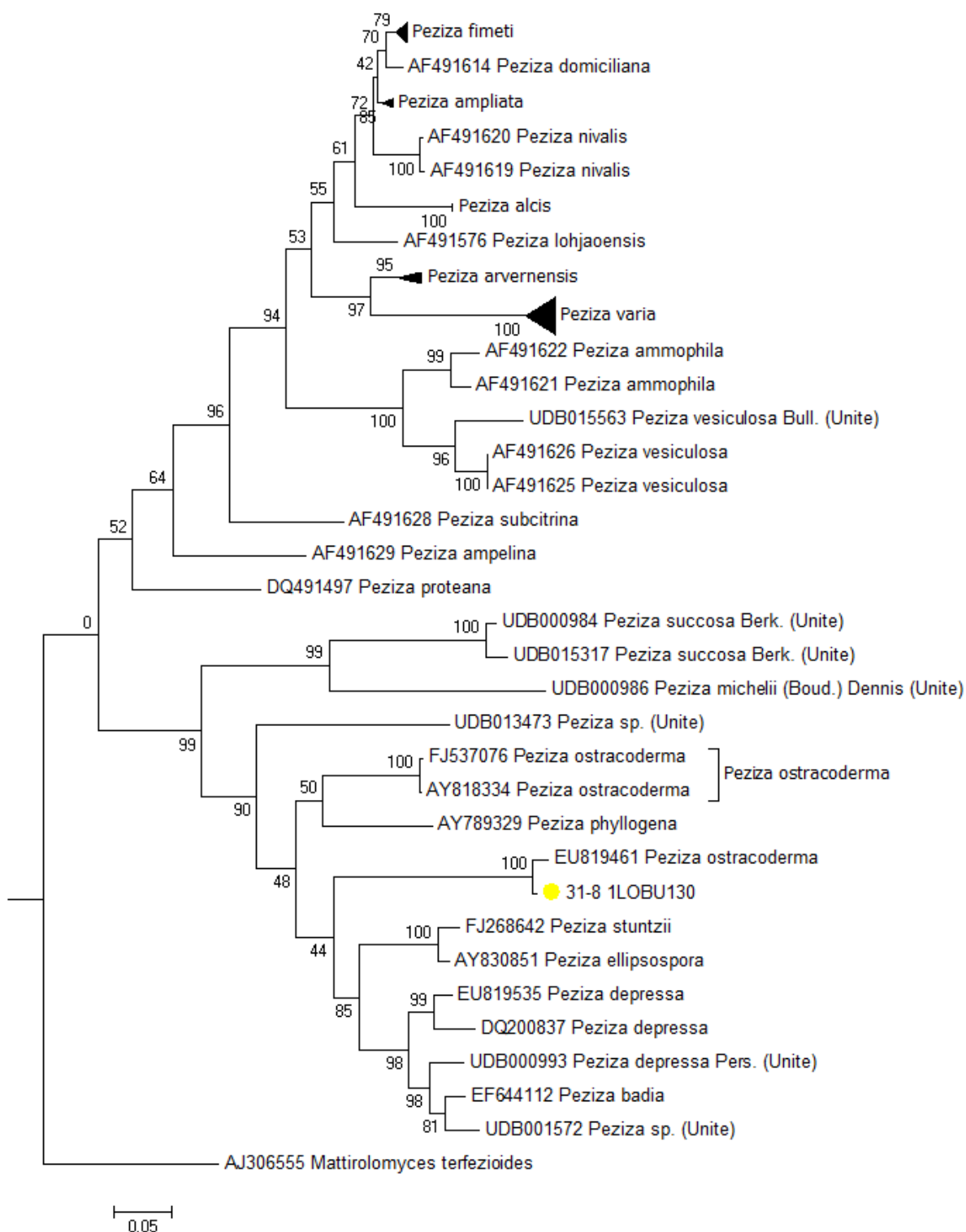
Slika 16: a-ektomikorizna gliva iz rodu *Peziza* sp., b-notranji parenhimatski plašč, c-zunanji parenhimatski plašč

Molekulske analize:

Nukleotidna zaporedja vzorcev so bila po primerjavi z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi Genbank najbolj podobna vrsti *Peziza ostracoderma*.

Filogenetske analize:

Parametre za filogenetsko drevo taksonomske enote *Peziza* smo izračunali s programom MEGA[®] 6.0 (Tamura in sod., 2013) z izborom modela (T92: Tamura-3-parametrični model) nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi Maximum Likelihood (2000 Bootstrap). Vrste iz poskusa se v filogenetskem drevesu razvrstijo med vrste *Peziza ostracoderma* iz spletne banke Genbank.



Slika 17: Filogenetsko drevo taksonomske enote *Peziza*, konstruiran po metodi Maximum likelihood (2000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumeno piko je označen vzorec iz našega poskusa.

4.2.5.2.1 *Hebeloma mesophaeum* (P.) Q.

Morfologija mikoriznega sistema:

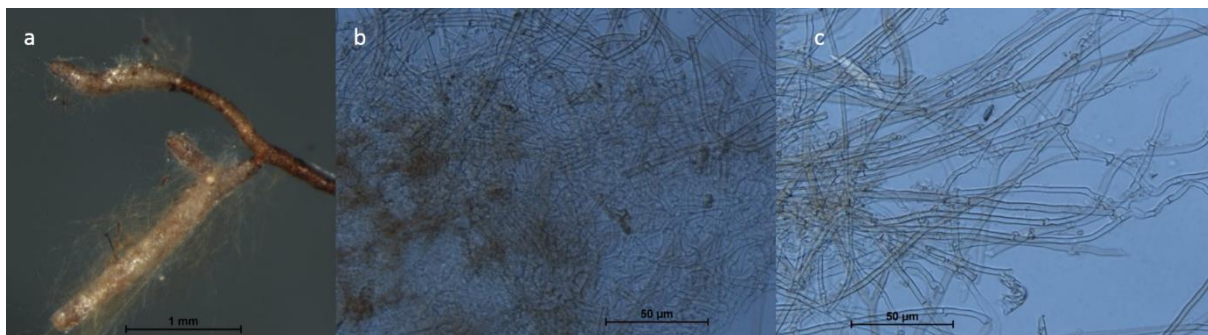
Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna
Površina:	gladka, svetleča
Dolžina:	do 25 mm
Premer osi:	do 0,5 mm
Obarvanost plašča:	bež do bela
Obarvanost apeksa:	bež do bel
Izhajajoči elementi:	hife
Eksploracijski tip:	eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

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

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	hife imajo zaponke, na posameznih mestih smo opazili odebelitve hif
Rizomorfi:	niso prisotni
Cistidiji:	niso prisotni



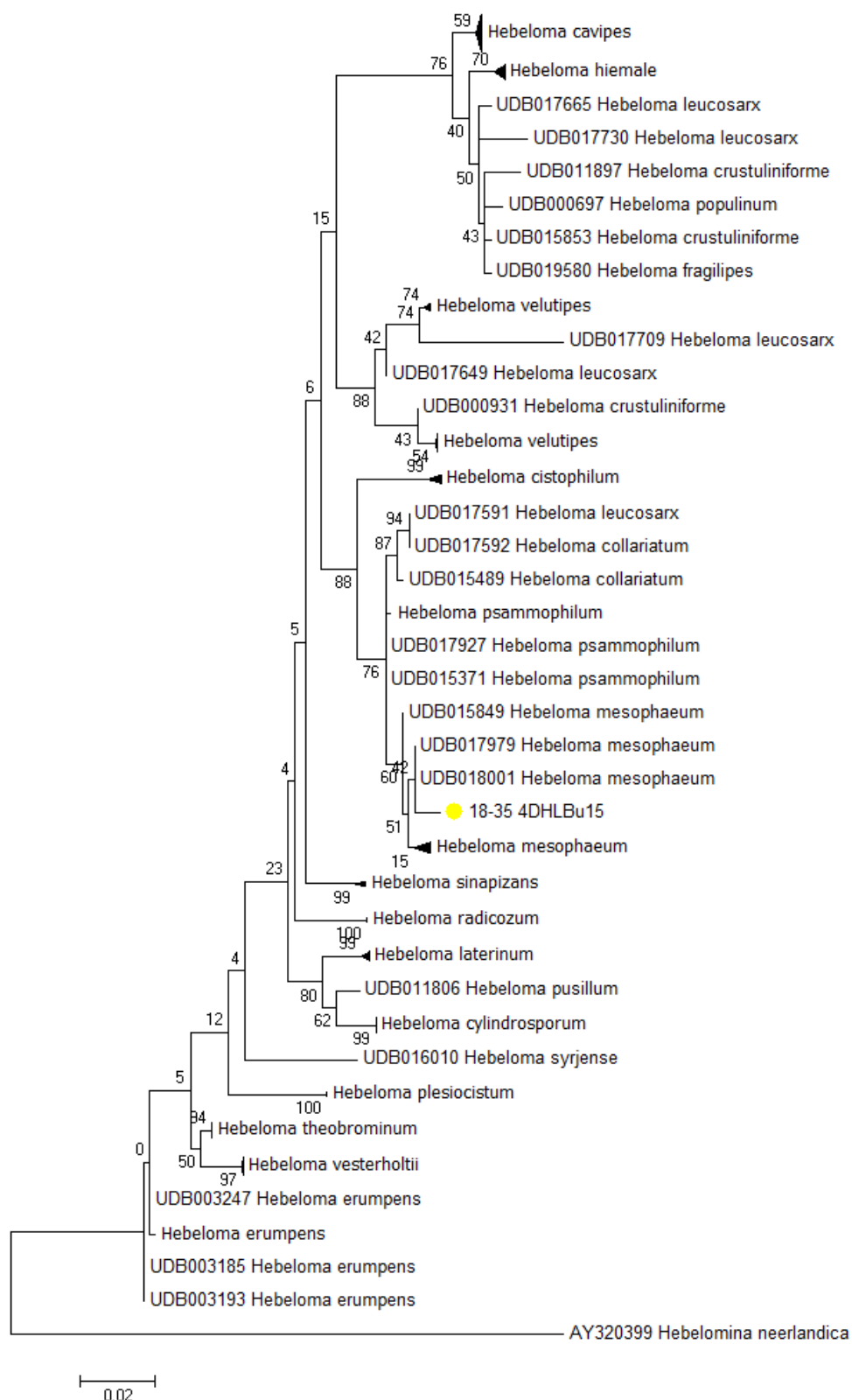
Slika 18: a-ektomikorizna gliva iz rodu *Hebeloma*; b-plektenhimatski plašč; c-hife z zaponkami in odebelitvami na posameznih mestih

Molekulske analize:

Nukleotidna zaporedja vzorcev so bila po primerjavi z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi Genbank najbolj podobna vrsti *Hebeloma mesophaeum*.

Filogenetske analize:

Parametre za filogenetsko drevo taksonomske enote *Hebeloma* smo izračunali s programom MEGA[®] 6.0 (Tamura in sod., 2013) z izborom modela (T92: Tamura-3-parametrični model) nukleotidnih substitucij glede na popravljen Akaikejev kriterij informativnosti (AICc-Akaike Information Criterion corrected). Filogenetsko drevo smo konstruirali po metodi Maximum Likelihood (2000 Bootstrap). Sekvence iz poskusa se uvrstijo v skupino sekvenc *Hebeloma mesophaeum*.



Slika 19: Filogenetsko drevo taksonomske enote *Hebeloma*, konstruiran po metodi Maximum likelihood (2000 Bootstrap), model T92: Tamura-3-parametrični model. Z rumeno piko je označen vzorec iz našega poskusa.

4.2.5.2.2 *Pulvinula* sp.

Morfologija mikoriznega sistema:

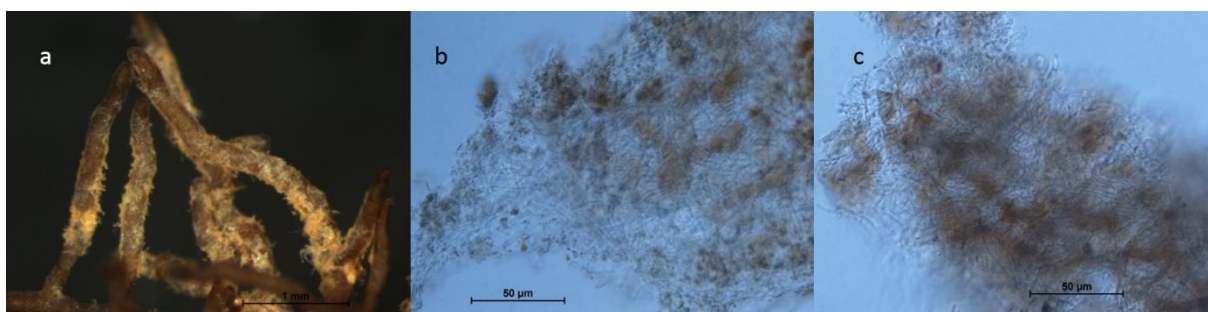
Razraščanje:	monopodialno piramidalno
Oblika:	ravna do rahlo ukrivljena
Površina:	gladka z delci substrata
Dolžina:	do 30 mm
Premer osi:	do 10 mm
Obarvanost plašča:	oker do rjava
Obarvanost apeksa:	oker do rjav
Izhajajoči elementi:	nismo opazili
Eksploracijski tip:	eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

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

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	niso prisotne
Rizomorfi:	niso prisotni
Cistidiji:	niso prisotni



Slika 20: a-ektomikorizna gliva iz rodu *Pulvinula*., b,c-zunanji plektenhimatski plašč

Molekulske analize:

Nukleotidna zaporedja vzorcev so bila po primerjavi z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi Genbank najbolj podobna vrstam iz rodu *Pulvinula*. Na osnovi podatkov molekulskih analiz nismo uspeli določiti vrste.

Filogenetske analize:

Filogenetskih analiz za rodu *Pulvinula* nismo naredili, ker se nukleotidna zaporedja ne poravnajo z nukleotidnimi zaporedji iz spletnih baz (GenBank in UNITE), oziroma so si po podobnosti najbolj podobne različnim vrstam oziroma rodovom.

4.2.5.3 *Trichophaea* sp.

Morfolologija mikoriznega sistema:

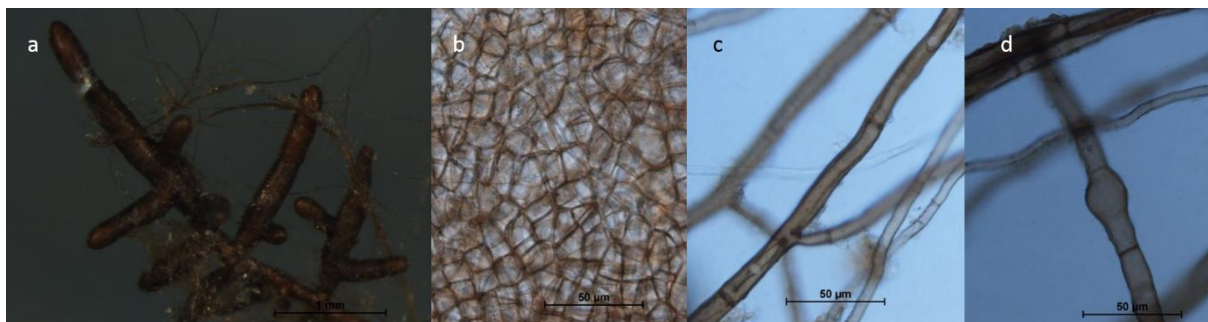
Razraščanje:	monopodialno piramidalno
Oblika:	ravna do rahlo ukrivljena
Površina:	gladka
Dolžina:	do 20 mm
Premer osi:	do 0,5 mm
Obarvanost plašča:	rjava, črna
Obarvanost apeksa:	rjav, črn
Izhajajoči elementi:	hife, pozamezni rizomorfi
Eksploracijski tip:	Eksploracijski tip na srednje razdalje, gladki podtip (MD ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

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

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	Hife so pogoste, septirane in brez zaponk. Na posameznih mestih je opaziti odebelitve hif in zrnate strukture na površini. Stena hif je rahlo rjavo obarvana.
Rizomorfi:	niso prisotni
Cistidiji:	niso prisotni



Slika 21: a-ektomikorizna gliva iz rodu *Trichophaea*, b-pseudoparenhimatski plašč tipa L, c-septirane hife, d-odebeljena hifa

Molekulske analize:

Nukleotidna zaporedja vzorcev so bila po primerjavi z nukleotidnimi zaporedji v spletni bazi Genbank najbolj podobna vrstam iz rodu *Trichophaea*. Na podlagi molekulskih analiz ne moremo sklepati o vrstah.

Filogenetske analize:

Filogenetskih analiz za rodu *Trichophaea* nismo naredili, ker v spletnih bazah (GenBank in UNITE) ni bilo dovolj sekvenc za primerjavo.

4.2.5.4 *Cenoccocum geophilum* Fr.

Morfologija mikoriznega sistema:

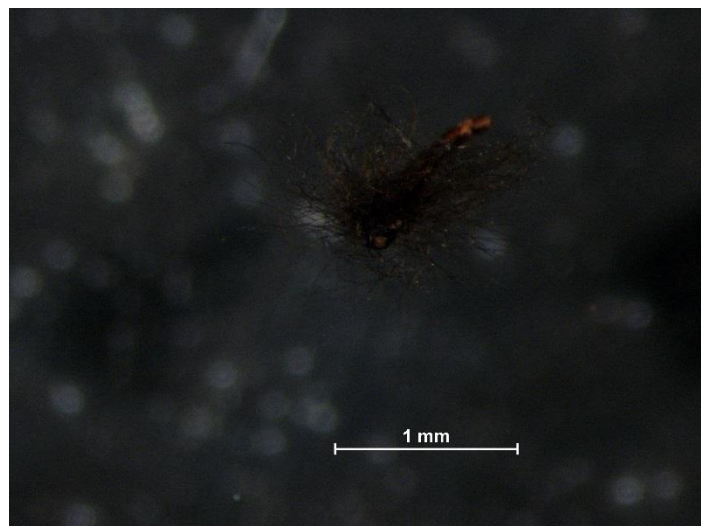
Razraščanje:	enostavno
Oblika:	ravna
Površina:	gladka
Dolžina:	do 0,5 mm
Premer osi:	do 0,1 mm
Obarvanost plašča:	črna
Obarvanost apeksa:	črn
Izhajajoči elementi:	hife
Eksploracijski tip:	eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET) (Agerer, 2001)

Anatomija plašča:

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

Anatomija izhajajočih elementov:

Hife:	Hife so pogoste, izraščajo pravokotno na mikorizno korenino pod apeksom
Rizomorfi:	niso prisotni
Cistidiji:	niso prisotni



Slika 22: Tip ektomikorize z vrsto *Cenococcum geophilum* Fr.

Molekulske analize:

Molekulskih analiz nismo delali, ker ni bilo dovolj vzorca.

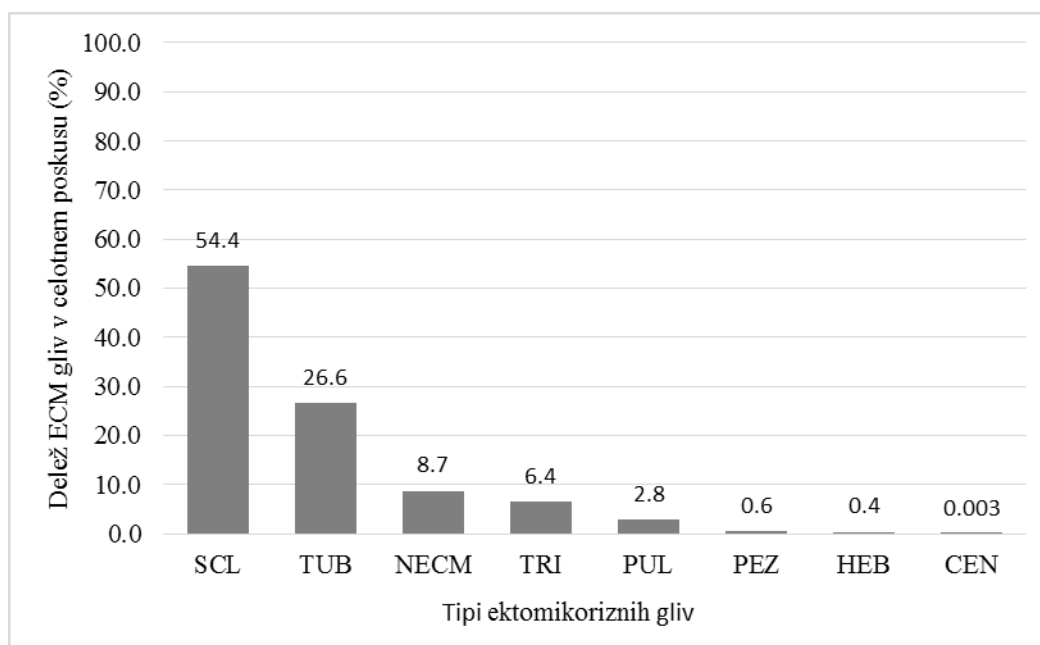
Filogenetske analize:

Filogenetskih analiz za omenjeno ECM glivo nismo delali.

4.2.6 Statistična analiza pestrosti ektomikoriznih gliv

4.2.6.1 Delež ektomikoriznih gliv v celotnem poskusu

V celotnem poskusu skupaj smo identificirali 6 tipov ECM, največkrat smo identificirali vrste iz rodov *Scleroderma* (54,4 %), sledile so vrste iz rodu *Tuber* (26,6 %), *Trichophaea* (6,4 %), *Pulvinula* (2,8 %), *Peziza* (0,6 %), *Hebeloma* (0,4 %) in *Cenococcum* (0,003 %) (Slika 23). Poleg ECM gliv, ki smo jih uspeli identificirati do rodu, smo v poskusu opisali še 8,7 % ECM gliv, ki jih nismo uspeli identificirati do rodu (Slika 23).



Slika 23: Delež ECM gliv v celotnem poskusu (%). NECM: neidentificirane ECM glive (n=19813), SCL: *Scleroderma* sp. (n=123577), TUB: *Tuber* sp. (n=60388), TRI: *Trichophaea* sp. (n=14609), PUL: *Pulvinula* sp. (n=6300), PEZ: *Peziza* sp. (n=1343), HEB: *Hebeloma* sp. (n=924), CEN: *Cenococcum* sp. (n=6).

Vrste iz rodu *Scleroderma* smo največkrat identificirali v klimatizirani komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (36,4 %), sledili so tretmaji v rastlinjaku (GH) (33,9 %), klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) (27,5 %) in zunaj (OUT) z 2,3 %. Vrste iz rodu *Tuber* smo prav tako največkrat identificirali v tretmaju z dodatnim hlajenjem (CR+) (62,9 %), sledil je tretma brez dodatnega hlajenja (CR-) (20,1 %), rastlinjak (GH) (10,3 %) in zunaj (OUT) (6,6 %). Vrste iz rodu *Pulvinula* smo identificirali le v treh tretmajih in sicer v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (93,0 %), brez dodatnega

hlajenja (CR-) (6,5 %) in v rastlinjaku (GH) (0,4 %). Vrste iz rodu *Trichophaea* smo identificirali le pri sadikah v klimatizirani komori, CR+ (6,2 %) in CR- (93,8 %). Po enkrat smo identificirali vrste iz rodu *Peziza* v tretmaju zunaj (OUT), *Hebeloma* sp. v tretmaju z dodatnim hlajenjem (CR+) in *Cenococcum* sp. v tretmaju brez dodatnega hlajenja (CR-). Največ neidentificiranih ektomikoriznih gliv smo opisali v tretmaju brez dodatnega hlajenja (CR-) (71,7 %), sledili so tretma z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (18,7 %), rastlinjak (GH) (6,7 %) in zunaj (OUT) (2,9 %) (Preglednica 17).

Preglednica 17: Delež posameznega tipa ektomikorize v vseh tretmajih. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; NECM: neidentificirane ECM glive, SCL: *Scleroderma* sp., TUB: *Tuber* sp., TRI: *Trichophaea* sp., PUL: *Pulvinula* sp., PEZ: *Peziza* sp., HEB: *Hebeloma* sp., CEN: *Cenococcum* sp.

		NECM	SCL	TUB	PUL	TRI	PEZ	HEB	CEN
Klimatizirana komora CR+ (%)		18.7	36.4	62.9	93.0	6.2	0	100	0
Klimatizirana komora CR- (%)		71.7	27.5	20.1	6.5	93.8	0	0	100
Rastlinjak	GH (%)	6.7	33.9	10.3	0.4	0	0	0	0
Zunaj	OUT (%)	2.9	2.3	6.6	0	0	100	0	0
Skupaj		100	100	100	100	100	100	100	100

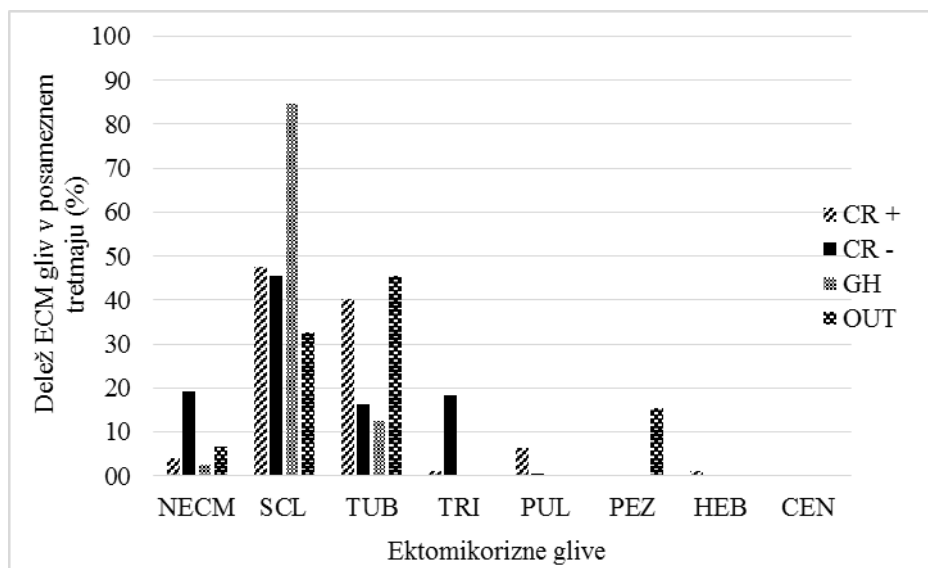
4.2.6.2 Delež posameznega tipa ektomikorize v tretmaju

V klimatizirani komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) smo največkrat opisali vrste iz rodu *Scleroderma* (47,6 %), sledile so vrste iz rodov *Tuber* (40,3 %), *Pulvinula* (6,2 %), neidentificirane ECM glive (3,9 %), *Trichophaea* (1,0 %) in *Hebeloma* (0,98 %) (Preglednica 18). Vrste iz rodov *Peziza* in *Cenococcum* nismo opazili. V klimatizirani komori brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) smo prav tako največkrat opisali vrste iz rodu *Scleroderma* (45,6 %), sledile so neidentificirane ECM glive (19,3 %), vrste iz rodov *Trichophaea* (18,4 %), *Tuber* (16,3 %), *Pulvinula* (0,6 %) in *Cenococcum* (0,008 %). Vrste iz rodov *Peziza* in *Hebeloma* nismo opazili (Preglednica 18). V rastlinjaku (GH) smo največkrat identificirali vrste iz rodu *Scleroderma* (84,7 %), sledile so vrste iz rodu *Tuber* (12,6 %), neidentificirane ECM glive (2,7 %) in vrste iz rodu *Pulvinula* (0,1 %). Vrste iz rodov *Trichophaea*, *Peziza*, *Hebeloma* in *Cenococcum* pri sadikah v rastlinjaku nismo opazili (Preglednica 18). Pri sadikah, ki so rastle zunaj smo največkrat opisali vrste iz rodu *Tuber* (45,6 %), sledile so vrste

iz rodov *Scleroderma* (32,6 %), *Peziza* (15,3 %) in neidentificirane ECM glive. Vrste iz rodov *Trichophaea*, *Hebeloma* in *Cenococcum* nismo opazili (Preglednica 18, Slika 24).

Preglednica 18: Analiza vrstne pestrosti ECM gliv v tretmaju. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; k.k.: kratke korenine; NECM: neidentificirane ECM glive, SCL: *Scleroderma* sp., TUB: *Tuber* sp., TRI: *Trichophaea* sp., PUL: *Pulvinula* sp., PEZ: *Peziza* sp., HEB: *Hebeloma* sp., CEN: *Cenococcum* sp.

MIKORIZNE K.									
Število kratkih korenin (k.k.) in delež tipa ECM (% ECM)		NECM	SCL	TUB	PUL	TRI	PEZ	HEB	CEN
število k.k. v CR +	(n)	3704	44925	38003	5862	909	-	924	-
število k.k. v CR -	(n)	14214	33944	12143	412	13700	-	-	6
število k.k. v GH	(n)	1320	41844	6234	26	-	-	-	-
število k.k. v OUT	(n)	575	2864	4008	-	-	1343	-	-
SUM		19813	123577	60388	6300	14609	1343	924	6
% ECM v poskusu		8.7	54.4	26.6	2.8	6.4	0.6	0.4	0.003
% ECM v tretmaju CR+		3.9	47.6	40.3	6.2	1.0	0	0.98	0
% ECM v tretmaju CR-		19.1	45.6	16.3	0.6	18.4	0	0	0.008
% ECM v tretmaju GH		2.7	84.7	12.6	0.1	0	0	0	0
% ECM v tretmaju OUT		6.5	32.6	45.6	0	0	15.3	0	0



Slika 24: Delež ECM gliv v posameznem tretmaju. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; k.k.: kratke korenine; NECM: neidentificirane ECM glive, SCL: *Scleroderma* sp., TUB: *Tuber* sp., TRI: *Trichophaea* sp., PUL: *Pulvinula* sp., PEZ: *Peziza* sp., HEB: *Hebeloma* sp., CEN: *Cenococcum* sp.

4.2.6.3 Izračun indeksov vrstne pestrosti ektomikoriznih gliv

Indeks bogastva vrst (d) povezuje število vrst in pomen posamezne vrste v skupnem številu. Največjo vrednost doseže v klimatizirani komori, v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) (0,36), sledi tretma z dodatnim hlajenjem korenin (CR+), kjer je indeks bogastva vrst le za 0,01 nižji, kljub temu, da smo v obeh tretmajih opisali enako število vrst (5). Prav tako smo v tretmajih GH in OUT opisali po 3 različne tipe mikoriznih gliv, vendar je indeks bogastva vrst zunaj (OUT) večji (0,22) kot v rastlinjaku (GH) (0,19) (Preglednica 19).

Shannon-Weaverjev indeks (H) izraža vrstno diverziteto združbe. Najvišjo vrednost smo zabeležili v klimatizirani komori, v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) (1,37), sledijo tretma z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (1,14), rastlinjak (GH) (0,85) in tretma zunaj (OUT) (0,80) (Preglednica 19).

Indeks uravnoteženosti (e) podaja porazdelitev osebkov po vrstah (Odum, 1971). Najvišjo vrednost (0,85) smo zabeležili v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin (CR-), sledijo rastlinjak (GH) (0,77), tretma zunaj (OUT) (0,73) in tretma z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (0,71) (Preglednica 19).

Preglednica 19: Izračun indeksov vrstne pestrosti mikoriznih gliv v tretmaju. CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj

	CR +	CR -	GH	OUT
Število tipov ECM (n)	5	5	3	3
bogastvo vrst (d)	0.35	0.36	0.19	0.22
Shannon-Weaverjev indeks (H)	1.14	1.37	0.85	0.80
Uravnoteženost (e)	0.71	0.85	0.77	0.73

4.2.6.4 Statistična analiza vpliva okoljskih dejavnikov (temperature in CO₂) na pestrost ECM gliv

Za preverjanje vpliva temperature in povišanih koncentracij CO₂ smo izbrali tri statistične metode:

1. Z metodo kontingenčnih tabel smo potrdili hipotezo, da obstajajo statistično značilne razlike v pestrosti ECM gliv med različnimi tretmaji. (H_0 = ni razlik v pestrosti ECM gliv med različnimi tretmaji; χ^2 vrednost = 26,8; df = (število tretmajev – 1*število gliv-1) = 18; p vrednost = 0,082)
2. Metoda Kruskal Wallis in Mann-Whitney U test

Z metodo Kruskal Wallis smo pokazali, da obstajajo statistično značilne razlike med tretmaji. (H_0 = med aritmetičnimi sredinami posameznih tretmajev ni statistično značilnih razlik; $p < 0,0001$).

Nadaljnja analiza podatkov z Mann-Whitney U testom je pokazala, da ne obstajajo statistično značilne razlike med tretmajema v klimatizirani komori ($p = 0.41794$) ali zgolj med rastlinjakom in tretmajem zunaj ($p = 0,35238$).

3. Multipla regresija

Analiza bivariantne korelacije je pokazala določeno vrednost povezanosti med vrednostmi CO₂ in temperaturo ($r^2 = 0,45$), vendar smo uporabili palčno pravilo za multikolinearnost, ki pravi, da multikolinearnost ne sme biti večja od 80%, zato predpostavljamo, da ta povezanost ne vpliva značilno na izračune glede na posamezni prediktor. Upoštevali smo tudi, da multikolinearnost nikoli ne vpliva na zanesljivost celotnega statističnega modela, ampak lahko vpliva le na posamezne prediktorje.

Kleinovo palčno pravilo pravi, da lahko multikolinearnost predstavlja težavo, če je r^2 prodobljen v bivariantni analizi večji od R^2 multiple regresije, kar v našem izračunu ni ($0,45 < 0,49$), zato lahko oba prediktorja uporabimo v multipli regresiji.

Rezultate analiz smo predstavili v prilogi C. Iz priloge C je razvidno, da vpliv temperature in povišane koncentracije CO₂ pojasni za slabo polovico celotne variacije pestrosti ECM gliv. Nestandardiziran koeficient B nam pove, za koliko enot se poveča ali pomanjša pestrost ECM gliv, (ena enota pomeni eno dodatno ECM glivo v vzorcu), če se povečata temperatura ali koncentracija CO₂ za eno enoto (stopinja Celzija ali ppm).

Tako temperatura kot povišana koncentracija CO₂ v zraku sta značilna prediktorja ($p < 0,05$), kar pomeni, da oba statistično značilno vplivata na pestrost ECM gliv in da pestrosti ne moremo pojasniti zgolj z enim izbranim prediktorjem.

4.2.6.5 Statistična analiza vpliva različnih eksploracijskih tipov na nadzemni in podzemni del sadik

Rezultati analiz so predstavljeni v prilogi D (nadzemni del) in prilogi E (podzemni del). Bivariantna analiza ni pokazala multikolinearnosti med posameznimi eksploracijskimi tipi, zato smo nadaljevali z metodo multiple regresije.

Analiza vpliva eksploracijskih tipov na maso nadzemnega dela sadik je pojasnila 58% variacije mase nadzemnega dela (priloga D), pri čemer na maso nadzemnega dela značilno vplivata le kontaktni eksploracijski tip (CT ET) in eksploracijski tip na dolge razdalje (LD ET) ($0 < 0,0001$, priloga D). Nestandardiziran koeficient B nam pove, da se denimo pri povečanju LD ET za eno enoto masa nadzemnega dela sadik poveča za skoraj 6 g.

Podobne rezultate smo dobili pri analizi vpliva eksploracijskih tipov na podzemni del sadik (priloga E), kjer smo z rezultati multiple regresije pojasnili 53% variacije v masi podzemnega dela (priloga E). Enako kot pri analizah nadzemnega dela, tudi pri vplivu na podzemni del eksploracijska tipa na kratke (SD ET) in srednje (MD ET) razdalje nimata značilnega vpliva pri napovedovanju mase korenin (priloga E).

Vpliva ET na življenjsko dobo drobnih korenin nismo statistično preučevali, ker bi za analize potrebovali še podatke o obratu drobnih korenin.

4.2.7 Rezultati analiz pestrosti ektomikoriznih združb v substratu z metodo DGGE (gelska elektroforeza v gradientu denaturantov)

Z analizami ektomikoriznih združb v substratu z metodo DGGE smo želeli preveriti pestrost mikoriznih gliv v substratu. Rezultati PCA analize so pokazali, da se glede na pestrost najbolj ločita tretmaja z dodatnim hlajenjem kroenin in tretma zunaj. Glede na diskriminatorno moč lis, se štiri lise pojavljajo v vseh štirih tretmajih, kar pomeni, da se nekatere vrste pojavljajo pri vseh temperaturah in so zato bolj konkurenčne. Posamezne lise se pojavljajo le pri tretmaju zunaj oziroma pri tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin. Opazili smo tudi, da je število lis največje v tretmaju zunaj, kar je verjetno posledica odprtega sistema in večje možnosti vnosa mikroorganizmov v rizotrone.

Od vseh tretmajev najbolj odstopa tretma zunaj (OUT) (Priloga B4), kjer je število lis največje (Preglednica 20). Najmanj lis smo opazili v rastlinjaku (GH) (priloga B3, Preglednica 20), medtem ko je število lis v tretmajih v klimatizirani komori (CR+ in CR-) enako (priloga B1 in B2, Preglednica 20). V vseh tretmajih skupaj smo zabeležili 113 lis.

Preglednica 20: Povprečno število lis, standardni odklon (SD) in število različnih lis v posameznem tretmaju. CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj.

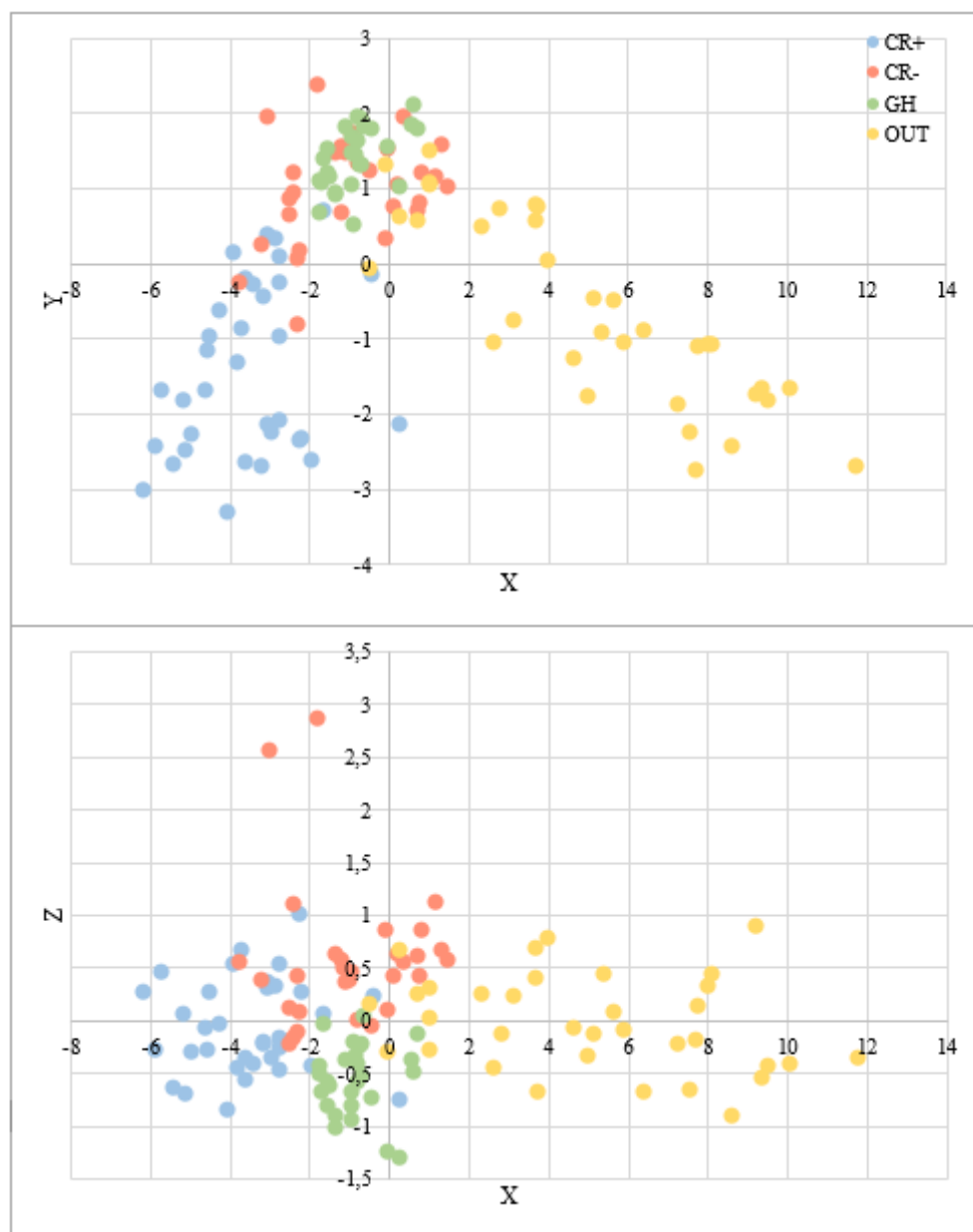
	CR+	CR-	GH	OUT
Povprečje	12,9	11,9	9,6	19,7
SD	3,8	3,2	2,6	6,3
Št. različnih lis (n)	66	66	49	90

PCA analiza je tretmaje ločila glede na tri osi: x os razloži 68,07 % variance, y os 23,92 % in Z os 8,01 % (Slika 25). Opazimo lahko, da se večina vzorcev tretmaja zunaj (OUT) in tretmaja v komori z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) jasno loči od ostalih in drug od drugega. Tretmaja v rastlinjaku (GH) in v komori brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) ne moremo jasno ločiti.

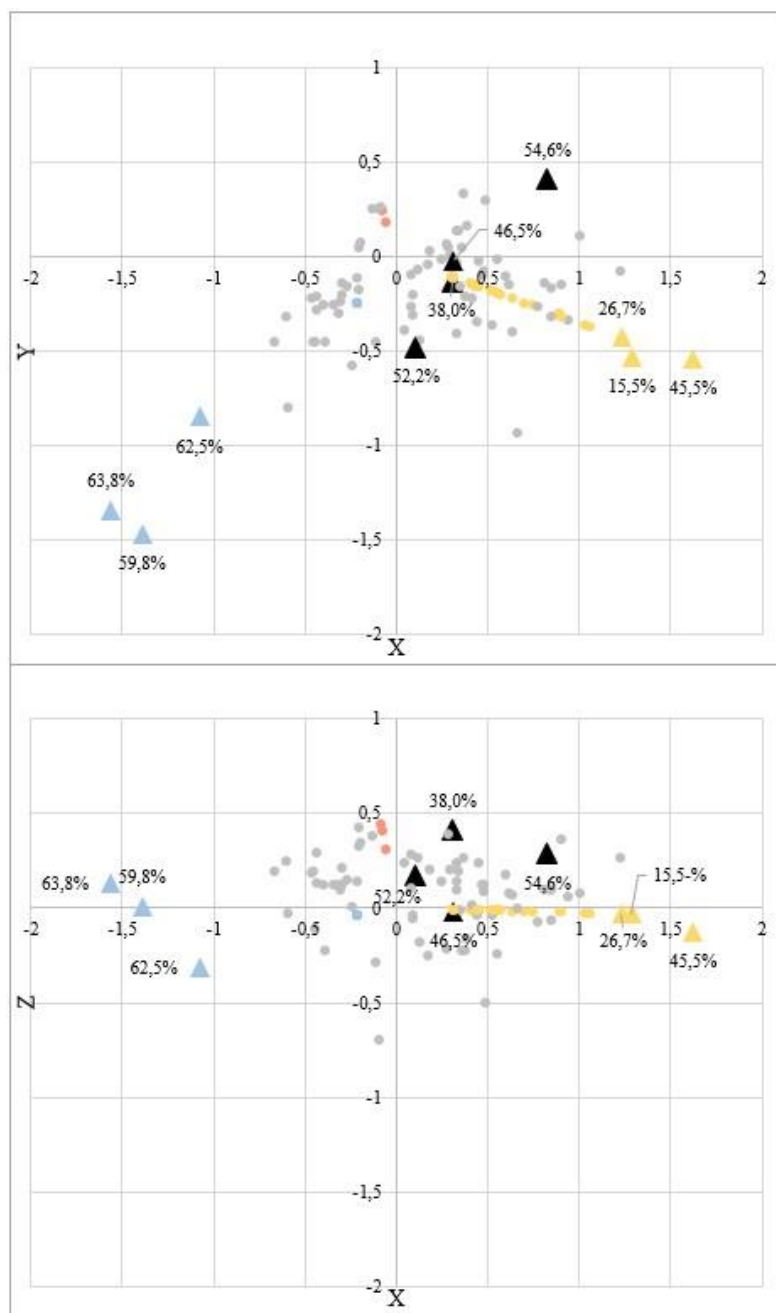
Razlikovanje med tretmaji glede na diskriminatorno moč lis opisuje Slika 26. Iz skupnega nabora lis lahko jasno ločimo nekatere lise tretmaja iz komore z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) in zunaj (OUT), ter posamezne lise, ki so pojavljajo pri vseh tretmajih. Rezultati

analize se skladajo z »Band matching« analizo (**Napaka! Vira sklicevanja ni bilo mogoče najti.**), ki prikazuje pogostost lis v posameznem tretmaju (spodaj) in intenzitete lis (zgoraj).

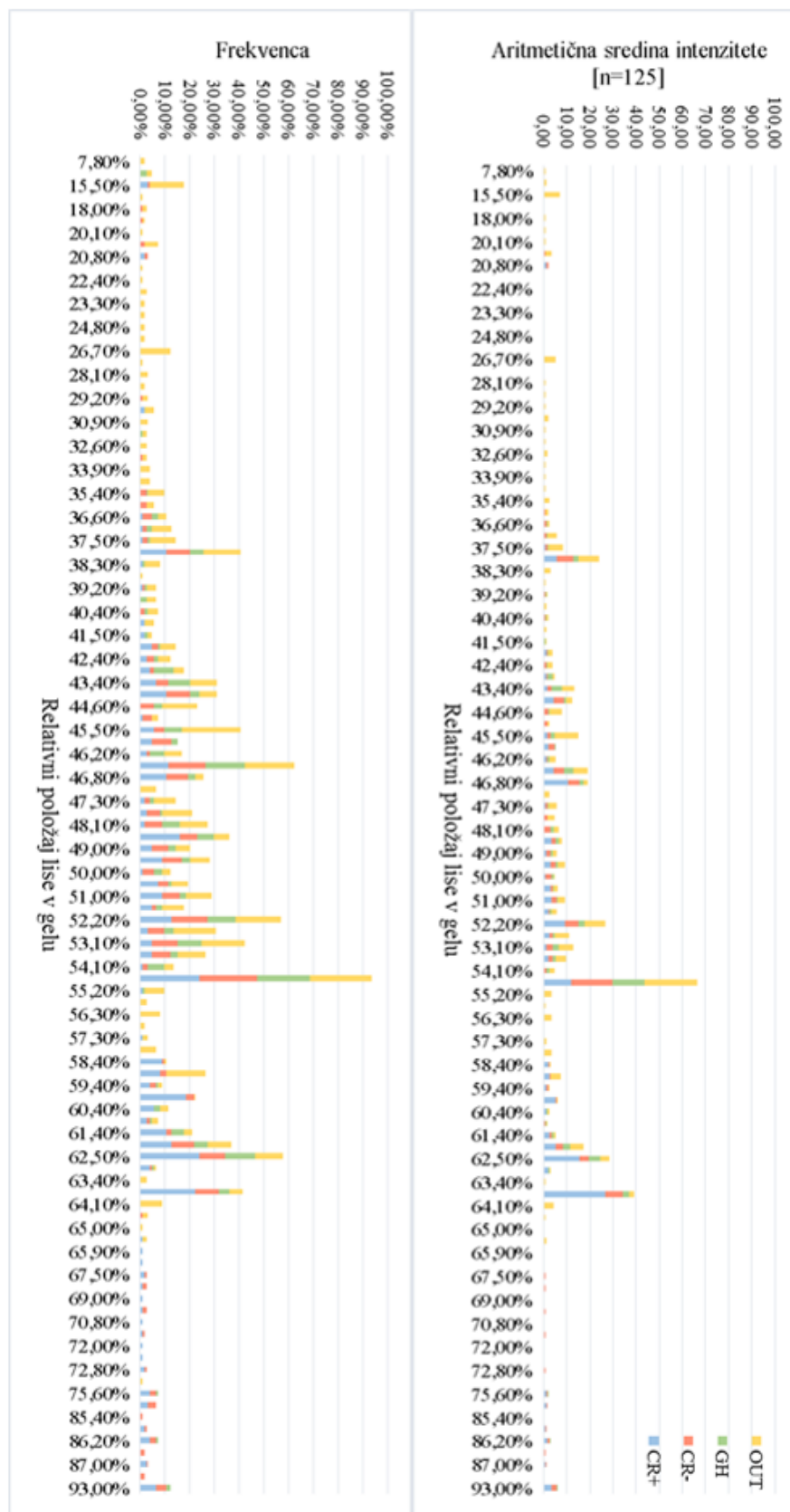
Glede na analize podatkov, pridobljenih iz »band matching« in PCA, smo lahko identificirali lise, ki so pomembne za vse štiri tretmaje (ubikvitarne) in tudi tiste, ki so značilne za posamezen tretma. Pri vseh tretmajih lahko opazimo prisotnost lis 38,0 %, 46,5 %, 52,2 % in 54,6 %, pri čemer je lisa 54,6 % prisotna pri največjem številu vzorcev in z največjo povprečno intenziteto. Za tretma CR+ je najbolj značilna in tudi dominantna lisa 63,8 %, v manjši meri pa sta značilni še lisi 59,8 % in 62,5 %. Za tretma OUT so značilne lise 45,5 %, 15,5 % in 26,7 %. Dominantne lise pri tretmajih CR- in GH so tiste, ki so značilne tudi za vse štiri tretmaje, ravno tako pri teh tretmajih nismo odkrili unikatnih lis. Na osnovi DGGE analize ne moremo sklepati o identiteti vrst, ki bi jih omenjene lise lahko predstavljale.



Slika 25: Rezultati analize PCA (angl. Principal Components Analysis) v treh dimenzijah. CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj



Slika 26: Rezultati analize PCA (angl. Principal Components Analysis) v treh dimenzijah glede na diskriminatorno moč lis. Sivi krogi: lise, ki bistveno ne prispevajo k ločevanju skupin; črni trikotniki: lise, ki se v večjem deležu pojavljajo pri vseh tretmajih; rumeni trikotniki: lise poskusa zunaj (OUT), ki najbolj prispevajo k ločevanju od drugih tretmajev; modri trikotniki: lise poskusa iz komore z dodatnim hlajenjem korenin (CR+), ki najbolj prispevajo k ločevanju od drugih tretmajev. Obarvani krogi predstavljajo lise, ki se pojavljajo samo pri enem izmed tretmajev, vendar zaradi majhne pogostosti in/ali intenzitete ne prispevajo k ločevanju tretmajev. Pri poglavitnih lisah (trikotniki) so označeni njihovi relativni položaji v gelu v odstotkih.



Slika 27: Rezultati analiz po metodi »Band matching«. Na sliki zgoraj so predstavljene kvantitativne vrednosti lis, na grafu spodaj pa frekvenca pojavljanja lis. CR+:klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj.

4.3 REZULTATI ANALIZ ENCIMSKE AKTIVNOSTI EKTOMIKORIZNIH GLIV

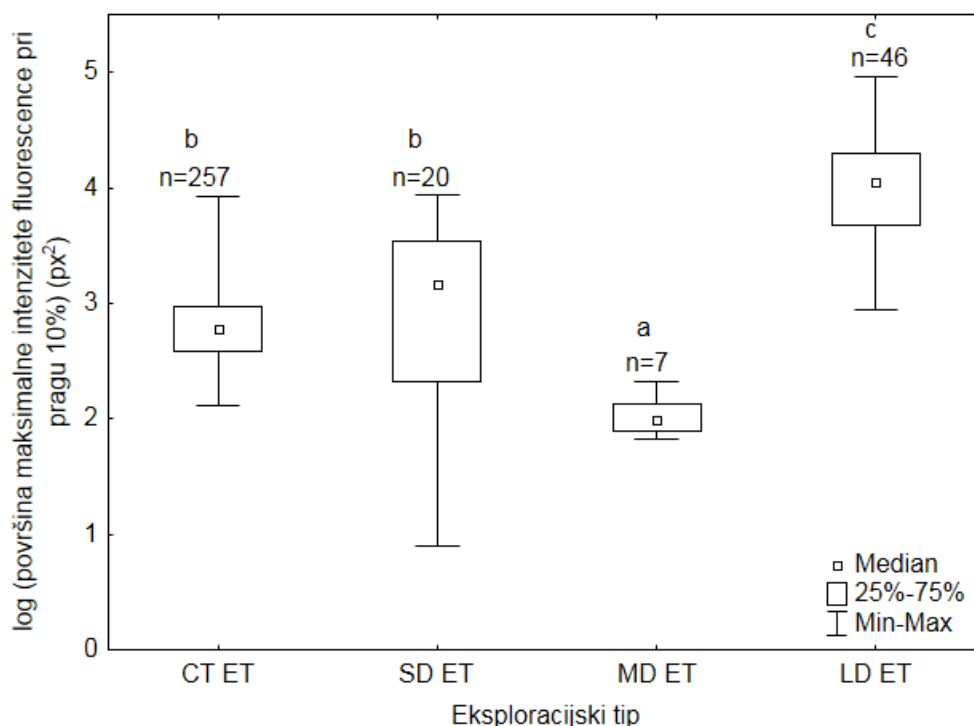
Pri analizi pojavljanja na površino vezane fosfataze (SBP) pri različnih eksploracijskih tipih (ET) smo opazili značilne razlike ($p < 0,001$) med vsemi eksploracijskimi tipi, razen med kontaktnim eksploracijskim tipom (CT ET) in eksploracijskim tipom na kratke razdalje (SD ET) (Preglednica 21, Preglednica 22, Slika 27). Največ encimov smo opazili pri eksploracijskem tipu na dolge razdalje, ki so bili tako na površini ektomikoriznega plašča, kot na izhajajočih elementih (hifah in rizomorfih) (Slika 28). Pri kontaktnem eksploracijskem tipu so vsi encimi na ektomikoriznem plašču, ker omenjeni tip nima izhajajočih elementov (Slika 28). Najmanj encimov smo opazili pri eksploracijskem tipu na kratke in srednje razdalje, ki se sicer pojavljajo tako na ektomikoriznem plašču, kot na izhajajočih elementih (Slika 28).

Preglednica 21: Razlike v površini nadprazne intenzitete fluorescence (NIF) med eksploracijskimi tipi (ET) in tretmaji pri pragu 10 %. Vrednosti so izražene kot mediana $\pm$ SE v slikovnih točkah-piksel (px^2).

	Število vzorcev (n)	p	Mediana NIF pri 10% ($\bar{x} \pm SE$) (px)	Min	Max
Kontaktne eksploracijske tip (CT ET)	257		2,78 $\pm$ 6,13 b	2,11	101,0
Eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET)	20	p<0,001	3,16 $\pm$ 0,82 b	0,9	3,94
Eksploracijski tip na srednje razdalje (MD ET)	7		1,92 $\pm$ 0,78 a	0,0	2,32
Eksploracijski tip na dolge razdalje (LD ET)	46		4,04 $\pm$ 0,47 c	2,94	4,96
Klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem (CR+)	16	p=0,361	4,12 $\pm$ 0,37 a	3,21	4,66
Klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja (CR-)	9		4,16 $\pm$ 0,37 a	3,74	4,86
Rastlinjak (GH)	11		3,53 $\pm$ 0,73 a	2,94	4,96
Zunaj (OUT)	10		3,83 $\pm$ 0,28 a	3,52	4,35

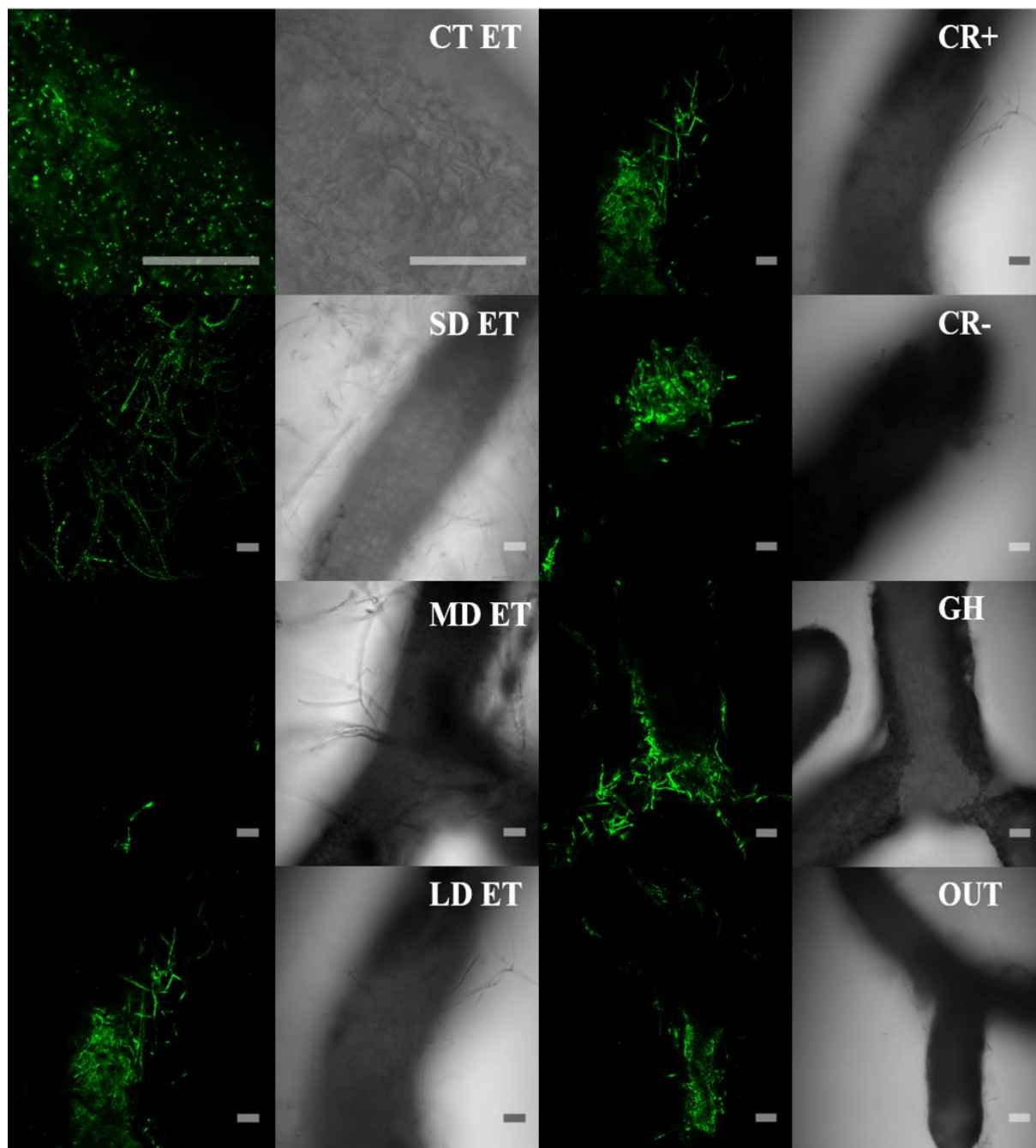
Preglednica 22: Značilne razlike med eksploracijskimi tipi izračunane z neparametričnim testom. Značilne razlike so zabeležene pri $p < 0,01$. n: število pregledanih slik

	CT ET	SD ET	MD ET	LD ET
CT ET	-	0,901215	0,001109	0,000000
SD ET	0,901215	-	0,000346	0,000011
MD ET	0,001109	0,000346	-	0,000000
LD ET	0,000000	0,000011	0,000000	-
n	257	20	7	46



Slika 27: Površina nadpražne intenzitete fluorescence pri pragu 10 % pri različnih eksploracijskih tipih (ET). Podatki so prikazani kot srednje vrednosti slikovnih točk-piksel (px²) (mediana±SE), zgornji in spodnji kvartil (25% in 75%) ter minimalne in maksimalne vrednosti (min-max). CT ET: kontaktni eksploracijski tip, SD ET: eksploracijski tip na kratke razdalje, MD ET: eksploracijski tip na srednje razdalje, LD ET: eksploracijski tip na dolge razdalje. n: število pregledanih slik za vsak ET

Različne temperature, ki so jim bile izpostavljene sadike, ne vplivajo značilno na pojavljanje na površino vezane fosfataze (SBP) (Preglednica 21). Analize so bile narejene na eksploracijskem tipu na dolge razdalje (LD ET) oziroma na vrsti iz rodu *Scleroderma* sp., ki smo jo opisali pri vseh tretmajih (Slika 28). Kljub neznačilnim razlikam smo opazili, da se encimi (SBP) v večjem številu (večja površina maksimalne intenzitete fluorescence na slikah) pojavljajo pri sadikah iz zunanjega tretmaja (OUT) in najmanjkrat pri sadikah iz rastlinjaka (GH).



Slika 28: Pojavljanje encimov (na površino vezane fosfataze – SBP) pri različnih eksploracijskih tipih (levo) in pri eksploracijskem tipu na dolge razdalje (LD ET) glive *Scleroderma* sp. iz različnih temperaturnih pogojev (desno). Za vsak ET in tretma je levo slika mikorizne glive z zeleno svetlobo (fluorescenco), ki označuje na površino vezano fosfatazo (SBP) in desno brez zelene svetlobe. CT ET: kontaktni eksploracijski tip, SD ET: eksploracijski tip na kratke razdalje, MD ET: eksploracijski tip na srednje razdalje, LD ET: eksploracijski tip na dolge razdalje, CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj. Merilce: 50 μm.

4.4 REZULTATI ANALIZ VSEBNOSTI STABILNIH IZOTOPOV $\delta^{13}\text{C}$ IN $\delta^{15}\text{N}$

Z rezultati analiz vsebnosti stabilnih izotopov dušika ($\delta^{15}\text{N}$) in ogljika ($\delta^{13}\text{C}$) smo dokazali pot dušika od mikoriznih gliv do listov in pot ogljika od listov do mikoriznih korenin. Mikorizne glive iz tal privzemajo dušik in same vgrajujejo težje izotope dušika, medtem ko lažje posredujejo rastlini, zato so mikorizne glive ^{15}N obogatene v primerjavi z listi rastline. Ravno obratno je pri kroženju ogljika. Rastline v ugodnih okoljskih razmerah vgrajujejo lažje oblike ^{13}C in so zato ^{13}C osiromašene glede na mikorizne korenine. Pri primerjavi tretmajev glede na razmerje $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti v listih smo opazili, da se tretmaja v klimatizirani komori razlikujeta od tretmajev zunaj in v rastlinjaku v $\delta^{13}\text{C}$ in da se tretma v rastlinjaku deloma loči od tretmaja zunaj glede na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$. Pri analizah stebela smo opazili, da se tretmaja v klimatizirani komori ločita od tretmajev v rastlinjaku in zunaj glede na vrednosti $\delta^{13}\text{C}$, medtem ko pri vrednostih $\delta^{15}\text{N}$ nismo opazili razlik. Pri analizah nemikoriznih korenin se tretmaja v klimatizirani komori ločita od tretmajev v rastlinjaku in zunaj glede na $\delta^{13}\text{C}$, in da se tretma z dodatnim hlajenjem korenin loči od tretmaja brez dodatnega hlajenja korenin glede na vsebnosti $\delta^{15}\text{N}$. Pri mikoriznih koreninah nismo opazili razlik med tretmajih kot tudi ne pri analizah substrata, kar smo pričakovali, saj je bil substrat v vseh tretmajih enak.

4.4.1 Izotopska sestava $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vzorcev v poskusu

Najbolj ^{15}N osiromašeni so listi iz poskusa brez dodatnega hlajenja korenin (-3,51 ‰), najmanj pa iz poskusa zunaj (-0,46 ‰). Poskusa iz klimatizirane komore imata podobne vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ v listih, medtem ko se v vrednostih $\delta^{15}\text{N}$ v stebelu razlikujeta. Stebela iz tretmaja z dodatnim hlajenjem korenin so najbolj ^{15}N obogatena (1,51 ‰), medtem ko so stebela iz tretmaja brez dodatnega hlajenja najbolj ^{15}N osiromašena (0,94 ‰). Mikorizne korenine so v vseh tretmajih ^{15}N obogatene v primerjavi z listi in stebli, razen v tretmaju zunaj, kjer so ^{15}N osiromašene v primerjavi s stebлом, vendar bolj obogatene od listov (Preglednica 23). Prav tako so mikorizne korenine ^{15}N obogatene v primerjavi z nemikoriznimi koreninami in substratom v vseh tretmajih.

Med eksploracijskimi tipi je najbolj ^{15}N osiromašen eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET) (-1,9 ‰), medtem ko je eksploracijski tip na dolge razdalje (LD ET) najbolj ^{15}N obogaten

(1,76 ‰). Pri eksploracijskem tipu na dolge razdalje smo opazili tudi največ hif in največ encimov (Preglednica 21, Slika 27). Eksploracijski tip na dolge razdalje je najbolj ¹⁵N obogaten v primerjavi z LD ET iz ostalih tretmajev. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ za LD ET v tretmaju brez dodatnega hlajenja in rastlinjaku se razlikujejo le za 0,02 ‰ (Preglednica 23). Razlika v vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ za eksploracijski tip na srednje razdalje (MD ET) med poskusoma v klimatizirani komori je 1,11 ‰. Za MD ET v rastlinjaku in tretmaju zunaj nimamo podatka, ker ju tam nismo identificirali. Podobno velja za $\delta^{15}\text{N}$ eksploracijskega tipa na kratke razdalje (SD ET), ki smo ga identificirali le v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin in znaša -1,9 ‰. Kontaktni eksploracijski tip (CT ET) je najbolj ¹⁵N obogaten v tretmaju zunaj (2,80 ‰) v primerjavi z ostalimi tretmaji in najmanj v rastlinjaku (0,72 ‰) (Preglednica 23).

Listi sadik so najbolj ¹³C osiromašeni v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin v primerjavi z ostalimi tretmaji, vendar so vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ listov sadik iz tretmaja z dodatnim hlajenjem korenin zelo podobne tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin, sledijo listi iz rastlinjaka in listi iz tretmaja zunaj, ki so najbolj ¹³C obogateni. Glede na liste so vsi ostali kompartmenti (steblo, mikorizne korenine, nemikorizne korenine in substrat) osiromašeni v vseh štirih tretmajih. Mikorizne korenine so v vseh tretmajih ¹³C obogatene v primerjavi z ¹³C listov in stebela, razen pri sadikah z dodatnim hlajenjem korenin (Preglednica 23).

Med eksploracijskimi tipi je najbolj ¹³C osiromašen eksploracijski tip na dolge razdalje (LD ET), v vseh tretmajih razen zunaj, kjer je bolj ¹³C obogaten kot kontaktni eksploracijski tip (CT ET). LD ET in CT ET sta najbolj ¹³C osiromašena v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin v primerjavi z drugimi tretmaji. Eksploracijski tip na srednje razdalje (MD ET) je bolj ¹³C osiromašen v poskusu brez dodatnega hlajenja (-33,05 ‰) kot v poskusu z dodatnim hlajenjem (-31,67 ‰). Za tretma v rastlinjaku in zunaj ni podatkov o vrednostih $\delta^{13}\text{C}$, ker nismo identificirali nobenega tipa MD ET. Podobno velja za eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET), ki smo ga identificirali le v poskusu z dodatnim hlajenjem korenin (Preglednica 23).

Preglednica 23: Vrednosti (povprečje $\pm$ SE) $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ za posamezne komponente v sistemu rastlina-mikoriza-substrat in posamezne eksploracijske tipe. Rezultati so izraženi v promilih (‰). LD ET: eksploracijski tip na dolge razdalje, MD ET: eksploracijski tip na srednje razdalje, SD ET: eksploracijski tip na kratke razdalje, CT

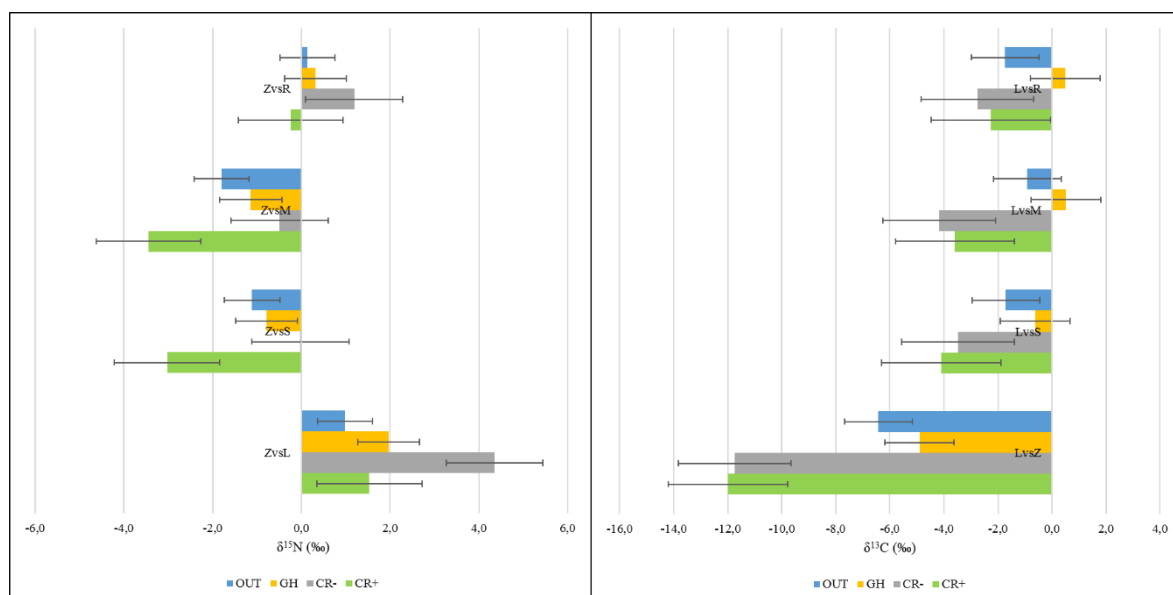
ET: kontaktni eksploracijski tip. CR+: dodatno hlajenje korenin, CR-: brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; n: število vzorcev

		n	CR+ ($\bar{x} \pm SE$)	CR- ($\bar{x} \pm SE$)	GH ($\bar{x} \pm SE$)	OUT ($\bar{x} \pm SE$)
$\delta^{15}N$	Listi	17/15/17/17	-3,05 $\pm$ 0,32	-3,51 $\pm$ 0,43	-1,63 $\pm$ 0,17	-0,46 $\pm$ 0,14
	Steblo	17/16/15/14	1,51 $\pm$ 0,37	0,87 $\pm$ 0,28	1,11 $\pm$ 0,18	1,58 $\pm$ 0,41
	Mikoriza	17/15/13/7	2,15 $\pm$ 0,49	1,61 $\pm$ 0,39	1,52 $\pm$ 0,26	2,31 $\pm$ 0,71
	CT ET	25/10/5/7	2,17 $\pm$ 0,47	1,18 $\pm$ 0,52	0,72 $\pm$ 0,89	2,80 $\pm$ 0,72
	SD ET	1/0/0/0	-1,9	-	-	-
	MD ET	2/8/0/0	-0,74 $\pm$ 2,41	0,37 $\pm$ 0,75	-	-
	LD ET	11/6/10/2	2,58 $\pm$ 0,71	1,84 $\pm$ 0,56	1,86 $\pm$ 0,20	0,77 $\pm$ 1,59
	Korenine	17/17/17/17	1,79 $\pm$ 0,43	1,34 $\pm$ 0,33	-0,06 $\pm$ 0,15	0,33 $\pm$ 0,15
	Substrat	17/15/15/17	-0,45 $\pm$ 0,17	0,79 $\pm$ 0,23	0,30 $\pm$ 0,18	0,46 $\pm$ 0,17
$\delta^{13}C$	Listi	17/15/17/17	-36,83 $\pm$ 0,23	-36,83 $\pm$ 0,40	-30,18 $\pm$ 0,29	-27,74 $\pm$ 2,54
	Steblo	17/16/15/15	-32,59 $\pm$ 0,20	-33,35 $\pm$ 0,31	-29,56 $\pm$ 0,14	-27,75 $\pm$ 1,99
	Mikoriza	17/15/13/9	-33,65 $\pm$ 0,28	-32,61 $\pm$ 0,64	-30,65 $\pm$ 0,30	-30,31 $\pm$ 0,53
	CT ET	25/12/5/7	-33,15 $\pm$ 0,30	-32,74 $\pm$ 0,84	-30,64 $\pm$ 0,31	-30,92 $\pm$ 0,58
	SD ET	1/0/0/0	-32,8	-	-	-
	MD ET	3/8/0/0	-31,67 $\pm$ 1,42	-33,05 $\pm$ 1,09	-	-
	LD ET	12/6/10/2	-33,77 $\pm$ 0,39	-33,05 $\pm$ 1,06	-31,09 $\pm$ 0,30	-30,62 $\pm$ 1,15
	Korenine	17/17/17/17	-34,63 $\pm$ 0,22	-34,57 $\pm$ 0,44	-32,48 $\pm$ 1,78	-29,70 $\pm$ 0,21
	Substrat	17/15/15/17	-24,90 $\pm$ 0,14	-25,04 $\pm$ 0,18	-25,28 $\pm$ 0,08	-25,02 $\pm$ 0,22

4.4.2 Primerjava rezultatov izotopske sestave $\delta^{15}N$ in $\delta^{13}C$ vzorcev v sistemu rastlina-mikoriza-tla

Podatke izotopske sestave posameznih enot (L: listi, S: steblo, M: mikorizne korenine, R: nemikorizne korenine, Z: substrat) v sistemu rastlina-mikoriza-tla smo za $\delta^{13}C$ normalizirali glede na vsebnosti $\delta^{13}C$ v listih (Preglednica 24), medtem ko smo za $\delta^{15}N$ podatke preračunali na vsebnost $\delta^{15}N$ v substratu (Preglednica 24). Pri analizah $\delta^{13}C$ smo opazili podobnosti med tretmajema v klimatizirani komori ter med rastlinjakom in tretmajem zunaj. V vseh primerih so sadike, ki so rastle zunaj (OUT) bolj obogatene s težjim ogljikom (^{13}C) od vzorcev iz

rastlinjaka (GH) in klimatizirane komore (CR+ in CR-) (Slika 29). Nemikorizne korenine ($\delta^{13}\text{C}_R=-2,3$) in mikorizne korenine ($\delta^{13}\text{C}_M=-3,6$) sadik z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) so v primerjavi z listi (L) obogatene s ^{13}C . Enako velja za sadike brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) ($\delta^{13}\text{C}_R=-2,8$; $\delta^{13}\text{C}_M=-4,2$) (Slika 29, Preglednica 24). Nasprotno velja za vzorce stebela (S) ($\delta^{13}\text{C}_S$ (CR+)=-4,1; $\delta^{13}\text{C}_S$ (CR-)=-3,5) in substrata (Z) ($\delta^{13}\text{C}_Z$ (CR+)=-12,0; $\delta^{13}\text{C}_Z$ (CR-)=-11,7) (Slika 29, Preglednica 24). V vseh štirih tretmajih so tla (Z) v primerjavi z listi (L) in nemikoriznimi koreninami (R) obogatena s težjim izotopom dušika v primerjavi s stebлом (S) in mikoriznimi koreninami (M). Mikorizne korenine (M) vseh štirih tretmajev so glede na substrat (Z) osiromašene s ^{15}N v primerjavi z nemikoriznimi koreninami (R). Podoben vzorec opazimo pri stebelu (S) sadik (Slika 29, Preglednica 24).



Slika 29: Izotopska sestava $\delta^{15}\text{N}$ (levo) in $\delta^{13}\text{C}$ (desno) vzorcev iz poskusa. Podatki so izraženi v promilih (‰). CR+: hladna soba z dodatnim hlajenjem korenin. CR-: hladna soba brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; L: listi, R: nemikorizne korenine, M: mikorizne korenine, S: steblo, Z: substrat

Preglednica 24: Izotopska sestava $\delta^{15}\text{N}$ (levo) in $\delta^{13}\text{C}$ (desno) izražena v ‰ vzorcev iz poskusa. CR+: klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj; L: listi, R: nemikorizne korenine, M: mikorizne korenine, S: steblo, Z: substrat

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)				$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
	Δ_{Z-L}	Δ_{Z-S}	Δ_{Z-M}	Δ_{Z-R}	Δ_{L-Z}	Δ_{L-S}	Δ_{L-M}	Δ_{L-R}
Klimatizirana komora (CR+)	1.53	-3.03	-3.45	-0.24	-12.0	-4.1	-3.6	-2.3
Klimatizirana komora (CR-)	4.36	-0.02	-0.49	1.19	-11.7	-3.5	-4.2	-2.8
Rastlinjak (GH)	1.96	-0.78	-1.14	0.32	-4.9	-0.6	0.5	0.5
Zunaj (OUT)	0.99	-1.11	-1.80	0.14	-6.4	-1.7	-0.9	-1.7

4.4.3 Primerjava tretmajev glede na rezultate $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$

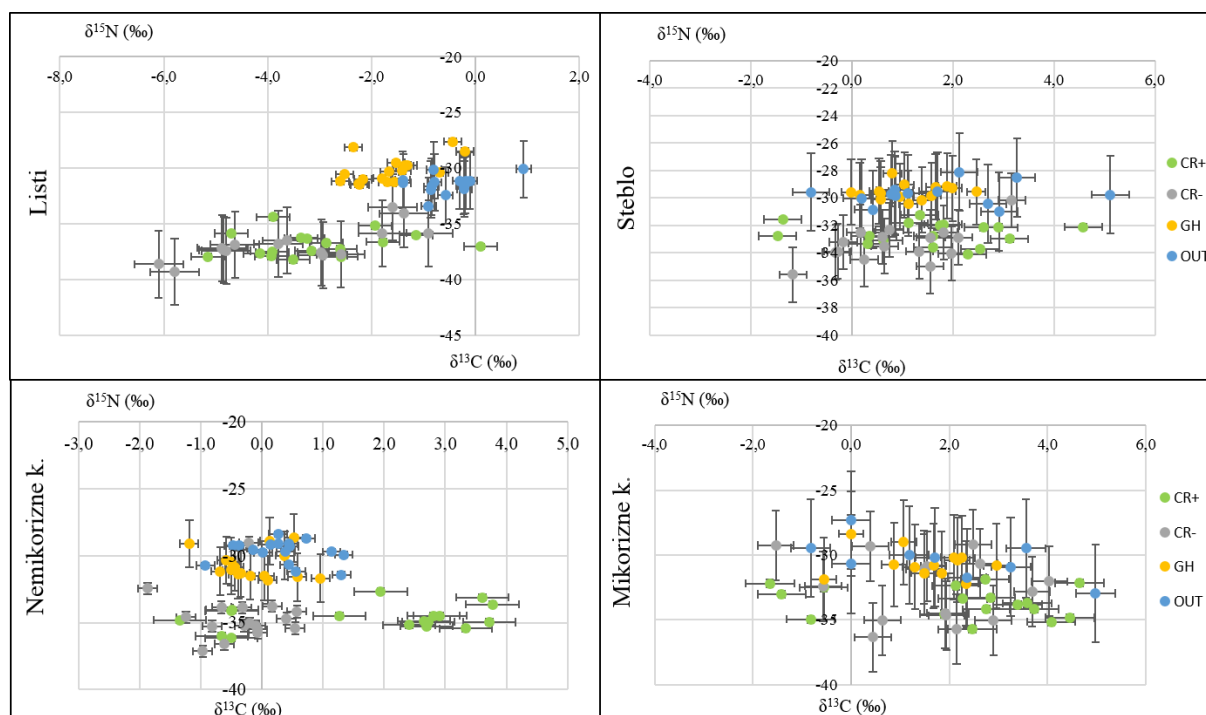
V izotopski sestavi listov smo opazili razlike v $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vrednostih med klimatizirano komoro (CR+ in CR-), rastlinjakom (GH) in zunaj (OUT) (Slika 30). Med tretmajema v klimatizirani komori ni razlik v $\delta^{13}\text{C}$ pri listih. Pri obeh se $\delta^{13}\text{C}$ giblje v območju med -45 in -35 ‰, medtem ko se vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ za rastlinjak (GH) in zunaj (OUT) gibljejo med -35 in -25 ‰ (Slika 30). Razlike med tretmaji smo opazili tudi v izotopski sestavi $\delta^{15}\text{N}$ (Slika 30). Listi sadik iz klimatizirane komore (CR+ in CR-) (-0,6 do -0,1 ‰) so v primerjavi z listi iz rastlinjaka (GH) (-0,3 do 0,00 ‰) in tretmaja zunaj (OUT) (-0,1 do 0,1 ‰) osiromašeni z ^{15}N . Prav tako so listi iz rastlinjaka (-0,3 do 0,00 ‰) osiromašeni z ^{15}N v primerjavi z listi zunanega tretmaja (-0,1 do 0,1 ‰).

Pri vzorcih stebel smo opazili razlike med $\delta^{13}\text{C}$ vrednostmi med tretmajema v klimatizirani komori (CR+ in CR-) ter rastlinjakom (GH) in tretmajem zunaj (OUT) (Slika 30). Stebla sadik iz klimatizirane komore (CR+ in CR-) imajo bolj negativne $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti (med -36 ‰

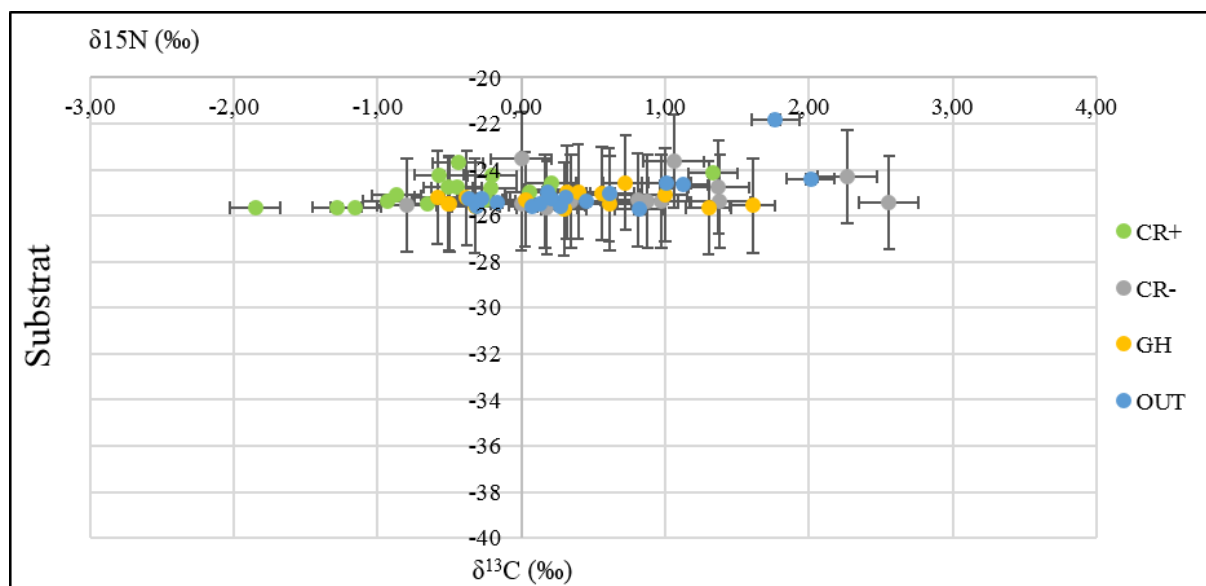
in -31 ‰) v primerjavi s stebli sadik iz rastlinjaka (GH) (-30 ‰) in tretmaja zunaj (OUT) (-30 ‰). Razlik med tretmaji med $\delta^{15}\text{N}$ vrednostmi v steblih nismo opazili (Slika 30).

Pri izotopski sestavi nemikoriznih korenin smo opazili razliko v razmerju $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vrednostmi med vsemi štirimi tretmaji. Nemikorizne korenine sadik tretmajev (CR+ in CR-) iz klimatizirane komore se ne razlikujejo v izotopski sestavi $\delta^{13}\text{C}$, medtem ko razlike opazimo pri $\delta^{15}\text{N}$ vrednostih, kjer so nemikorizne korenine sadik brez dodatnega hlajenja (CR-) (med -0,1 in 1,0 ‰) osiromašene z ^{15}N v primerjavi z nemikoriznimi koreninami sadik z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (med 1,0 in 4,0 ‰) (Slika 30). Prav tako med sadikami v rastlinjaku (GH) in zunaj (OUT) ni razlik v izotopski sestavi ogljika nemikoriznih korenin, medtem ko za $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti lahko rečemo, da so nemikorizne korenine sadik iz rastlinjaka (GH) (med -0,1 in 1,0 ‰) morda nekoliko bolj osiromašene z ^{15}N kot pri tretmaju zunaj (OUT) (med 0,0 in 1,0 ‰) (Slika 30). Razlike smo opazili tudi pri $\delta^{13}\text{C}$ vrednostih vzorcev nemikoriznih korenin med tretmajema v klimatizirani komori (CR+ in CR-), katerih $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti so bolj negativne (med -38,0 in -32,0 ‰) od tretmajev v rastlinjaku (GH) in zunaj (OUT), ki sta bolj obogatena s ^{13}C (med -32,0 in -28,0 ‰) (Slika 30).

Pri izotopski sestavi ogljika in dušika v vzorcih nemikoriznih korenin in substrata (Slika 31) nismo opazili razlik med tretmaji.



Slika 30: Primerjava tretmajev glede na razmerje $\delta^{15}\text{N} / \delta^{13}\text{C}$ v listih, steblo, mikoriznih in nemikoriznih koreninah. Podatki so izraženi v promilih (‰). CR+: klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj



Slika 31: Primerjava tretmajev glede na razmerje $\delta^{15}\text{N} / \delta^{13}\text{C}$ v substratu (Z). CR+: klimatizirana komora z dodatnim hlajenjem korenin, CR-: klimatizirana komora brez dodatnega hlajenja korenin, GH: rastlinjak, OUT: zunaj

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 TIPI EKTOMIKORIZE NA BUKVI

Tipe ektomikorize na sadikah bukve v pilotnem poskusu smo določali na tri načine, z anatomsko-morfološko metodo (Agerer, 1987-2008), z analiziranjem ITS ribosomalne regije DNA (Hibbett in sod., 2011) in z izdelavo filogenetskih dreves (Grebenc in sod., 2009). Z anatomsko-morfološko metodo smo do vrste uspeli določiti le *Cenococcum geophilum*, saj skladno z drugimi avtorji (Kraigher in sod., 1995; Püttsepp in sod., 2004) z omenjeno metodo le redko določimo tipe ektomikorize do vrste. Vrsto *Cenococcum geophilum* smo z anatomsko-morfološko metodo uspeli določiti tudi v diplomskem delu na sadikah bukve (Štraus, 2010). Danes vzporedno z anatomsko-morfološko metodo (Agerer, 1987-2008), pogosto uporabljamo še molekulске metode, oziroma pomnoževanje DNA 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). Poleg molekulskih analiz smo naredili tudi filogenetske analize (Avisé, 2006; Baum, 2008) z namenom določitve tipov ektomikorize do vrste v tistih primerih, ko nam to ni uspelo s primerjanjem sekvenc s spletnimi bazami podatkov (Köljalg in sod., 2013).

Agerer (2001) je vrste iz rodu *Scleroderma* uvrstil v skupino eksploracijskih tipov na dolge razdalje (LD ET), saj razvijejo zelo diferencirane rizomorfe, s katerimi se razraščajo v okoliški substrat in privzemajo hranilne snovi, ki jih izmenjujejo z rastlinskim partnerjem. Poleg tega lahko vrsta *Scleroderma citrinum* sodeluje pri pick-a-back eksploracijskem tipu v povezavi s *Xerocomus parasiticus*, ki se z rizomorfi tipa F povezuje z rizomorfi *S. citrinum*. V nalogi je bila *Scleroderma* sp. največkrat identificirana ektomikorizna gliva v vseh tretmajih, razen v tretmaju zunaj, kjer smo večkrat identificirali vrste iz rodu *Tuber* (Slika 23, Slika 24). Ektomikoriznih gliv iz rodu *Scleroderma* sp. v poskusu nismo uspeli identificirati do vrste niti s filogenetskimi analizami. Težave pri identifikaciji ektomikoriznih gliv iz rodu *Scleroderma* smo imeli tudi v diplomski nalogi (Štraus, 2010), kjer smo tipe ektomikorize sicer analizirali tako pri sadikah iz slovenskega predalpskega provenienčnega območja v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (CR+), kot pri sadikah provenience Osankarica, kjer smo opravili

nedestruktivne analize na sadikah, ki smo jih vključili v doktorsko nalogo. Po primerjavi sekvenc z bazami podatkov smo dobili dva zadetka, *Scleroderma areolatum* in *Scleroderma verrucosum*, z visokim odstotkom podobnosti, zato na osnovi teh podatkov ne moremo sklepati, katera od obeh vrst je prava. V ta namen smo izdelali filogenetsko drevo za rod *Scleroderma*, kjer se vzorci iz analiz v dendrogramu uvrstijo v skupino (grozd) vrste *Scleroderma areolatum*. Poleg teh se v omenjeno skupino uvrstijo tudi sekvence, ki so klasificirane kot *S. verrucosum*. Ker večina sekvenc in *S. areolatum* tvori jasno ločena in koherentna grozda, je možno, da so avtorji objave vrst *S. verrucosum* napačno identificirali dotično glivo na osnovi morfološko-anatomskega kriterijev (os. kom. Marko Bajc). Kljub temu ne moremo jasno določiti, kateri izmed obeh vrst pripadajo sekvence, ki smo jih identificirali v poskusu, razen za eno vrsto iz tretmaja brez dodatnega hlajenja korenin (1NHLBU33), ki se ločeno uvrsti v skupino vrste *S. verrucosum* (Slika 13).

Verjetno najbolj raziskane ektomikorizne glive so tartufi iz rodu *Tuber* (Smith in Read, 2008). Prvotno tartufi izhajajo iz Evrope, jugovzhodne Azije in severne Amerike, vendar so nekatere vrste, še posebej gurmansko pomembne vrste črnih tartufov (*Tuber melanosporum*), danes splošno razširjene povsod po svetu (Smith in Read, 2008). Agerer (2001) je vrste iz rodu *Tuber* uvrstil v dve skupini eksploracijskih tipov, vrste s kratkimi cistidiji je uvrstil med kontaktni eksploracijski tip (CT ET), medtem ko je vrste z dolgimi cistidiji uvrstil v skupino eksploracijskih tipov na kratke razdalje (SD ET). Vrste, ki smo jih identificirali pri sadikah bukve v poskusu smo glede na kratke cistidije uvrstili v skupino kontaktnega eksploracijskega tipa. *Tuber* sp. tvori mikorizo s širokim spektrom rastlinskih vrst in za razvoj zahteva pH tal v območju 7-8 (Smith in Read, 2008). Hobbie in Högberg (2012) poročata o visokih vrednostih $\delta^{15}\text{N}$ vrst iz rodu *Tuber* glede na ostale vrste v raziskavi, kar je nekoliko nenavadno, saj primarno kolonizirajo mineralna tla (Buée in sod., 2007), kjer so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ nižje; višje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ povezujejo z $\delta^{15}\text{N}$ vrednostmi organskih tal, kjer so bili vzorci nabrani. Možnost privzemanja hranilnih snovi iz odmrlega rastlinskega tkiva ali iz organskih snovi v tleh sta ugotovila že Finlay in Read leta 1986. . Najvišji delež ektomikoriznih gliv *Tuber* sp. v tretmaju zunaj (Slika 24) je morda povezan z najvišjim deležem nemikoriznih korenin (vendar ne odmrlih) (Slika 11) in najvišjimi vrednostmi $\delta^{15}\text{N}$ v substratu glede na ostale tretmaje (Preglednica 23). Saprofitski način delovanja nekaterih mikoriznih gliv je lahko povezan z

razvojem etomikoriznih gliv, saj nekatere teorije razvoja in filogenetske analize predvidevajo, da so se ektomikorizne glive razvile iz saprofitskih oblik gliv (Smith in Read, 2008). Taylor in sod. (2003) poudarjajo, da je pri razlikovanju med saprofitskimi in ektomikoriznimi glivami na osnovi analiz $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ potrebno biti zelo previden, kljub temu da so dokazali majhno statistično razliko med obema skupinama. Le Tacon in sod. (2013) poročajo, da *Tuber melanosporum* shranjuje ogljik v mikoriznem tkivu (askokarp), ki služi kot rezerva za zimsko obdobje. Skoraj ves ogljik, ki ga rastlina proizvede v metabolnih procesih, je transportiran v ektomikoriznega partnerja, medtem ko rastline same uporabijo za svojo rast le 1 % ogljika med rastno sezono. Kljub temu so nekateri raziskovalci dokazali vpliv na povečano biomaso rastlin v simbiozi s tartufi tako v naravnih okoljih kot v drevesnicah (Smith in sod., 2011). V poskusu nismo uspeli identificirati ektomikoriznih gliv do vrste, kljub filogenetskim analizam. Enake težave pri identifikaciji so se pojavile tudi v diplomskem delu (Štraus, 2010). Za rod *Tuber* smo izdelali filogenetsko drevo (Slika 15), 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 neklasificiranimi vzorci iz rodu *Tuber*. Najbolj sorodna grozda tako predstavljata 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 kolonizacije korenin bukvic tudi z inokulumom omenjenih dreves neznanega porekla (os. kom. dr. Tine Grebenc).

Vrsto *Hebeloma mesophaeum* smo identificirali le v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (Preglednica 17, Slika 24). Glede na eksploracijske tipe, ki jih je definiral Agerer (2001), smo jo uvrstili med eksploracijske tipe na kratke razdalje (SD ET). Cripps (2004) navaja, da je *H. mesophaeum* v majhnem sestoju trepetlike limitna vrsta (1,5 % glede na vse mikorizne vrste v sestoju) in zato manj pomembna med ektomikoriznimi glivami glede na

relativno frekvenco in relativno prisotnost v sestoji. Ravno nasprotno navajajo Buée in sod. (2005) za vrste iz rodu *Hebeloma* sp. v bukovem razredčenem gozdu (170 dreves na ha) na območju severovzhodne Francije, kjer je omenjeni rod glede na pojavljanje na tretjem mestu od 35-ih rodov, identificiranih v poskusu. Poročajo tudi, da so vrste iz rodu *Hebeloma* bolj encimsko aktivne v poletnem času, glede na zimski čas, ko je temperatura tal višja za 12 °C. Hobbie in Högberg (2012) sta pri analizi vzorcev dušikovih izotopov pri različnih eksploracijskih tipih za dve vrsti iz rodu *Hebeloma* sp. izmerila visoke vrednosti $\delta^{15}\text{N}$, za katere predvidevata, da so posledica asimilacije obogatenih oblik amoniaka. V poskusu smo sicer identificirali le en primer vrste *Hebeloma mesophaeum*, ki je bila najbolj ^{15}N osiromašena glede na ostale eksploracijske tipe (CT ET, MD ET, LD ET), vključene v analizo (Preglednica 23).

C. geophilum je geografsko zelo razširjena vrsta z zelo širokim spektrom avtotrofnih partnerjev in je pogosto vključena v številne raziskave. Na območjih, kjer se pojavlja, pogosto postane dominantna gliva (Smith in Read, 2008). Grebenc in sod. (2009) poročajo, da so *C. geophilum* identificirali tako v bukovem sestoji kot v vrzeli na štirih ploskvah v severnem (Danska) in južnem (Slovenija) delu Evrope. V poskusu smo *C. geophilum* identificirali v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) (Preglednica 17, Preglednica 18), medtem ko smo ektomikorizno glivo v diplomskem delu (Štraus in sod., 2011) identificirali le v rastlinjaku in skleпали, da se je razširila predvsem zaradi povišanih temperatur, kar sovpada z raziskavami Buée in sod. (2005), ki poročajo, da delež glive *C. geophilum* v razredčenem gozdu v zimskem času upade (7 %), medtem ko se tekom poletja delež poveča (19 %). Poleg tega so dokazali vpliv temperature tal na pojavljanje in tudi metabolno aktivnost, saj je delež večji v času, ko je temperatura tal višja za kar 12 °C. Povečano pojavljanje *C. geophilum* pri višjih temperaturah zraka (+2-3 °C) so opazili Herzog in sod. (2013) pri treh vrstah hrasta (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*), medtem ko suša ne vpliva na pojavljanje pri *Q. robur*, oziroma je pojavljanje značilno nižje pri vrstah *Q. petraea* in *Q. pubescens*. Prav tako poročajo tudi o povečani skupni encimski aktivnosti pri povišanih temperaturah. Alvarez in sod. (2005) poročajo, da je pojavljanje kisle fosfataze pri *C. geophilum* (maksimalna fluorescenca ELF-97) največje pri pH 4, medtem ko encimska aktivnost doseže vrh pri pH 5-6. Poleg tega poročajo, da so encimi le na območju med mikoriznim plaščem in celicami primarne skorje korenin, medtem ko jih v/na izhajajočih hifah ni, za razliko od ektomikorizne

glive *Pisolithus tinctorius* (LD ET), kjer se encimi bolj množično pojavljajo na izhajajočih elementih. 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 (Agerer, 1987-2008) uvršča med neidentificirane tipe ECM. *C. geophillum* uvrščamo med eksploracijske tipe na kratke razdalje (SD ET) (Agerer, 2001).

Ektomikorizni vrsti iz rodu *Trichophaea* in *Peziza* iz naloge smo identificirali s pomočjo molekulskih in filogenetskih analiz. Ektomikorizne glive iz rodu *Trichophaea* nismo mogli vključiti v filogenetske analize zaradi premajhnega števila sekvenc v spletnih bazah podatkov GenBank (Genbank, 2014) in UNITE (Kõljalg in sod., 2013), medtem ko smo vrste iz rodu *Peziza* sp. s filogenetskimi analizami uspeli določiti do vrste *Peziza ostracoderma*. Enake rezultate analiz za ektomikorizno glivo *P. ostracoderma* smo dobili tudi pri diplomski nalogi v tretmajih v klimatizirani komori in zunaj (Štraus, 2010; Štraus in sod., 2011). Obe vrsti se uvrščata med askomicetne glive iz redu *Pezizales* (Smith in Read, 2008), ki je precej neraziskan. Tedersoo in sod. (2006) poudarjajo, da red *Pezizales* vključuje večje število ektomikoriznih gliv, kot so sprva domnevali, in da se bo število identificiranih vrst še povečalo. Za omenjene ektomikorizne tipe je značilno, da razvijejo pseudoparenhimatski plašč z redkimi izhajajočimi elementi (hifami), medtem ko ne tvorijo rizomorfov (Smith in Read, 2008; Tedersoo in sod., 2006). Smith in Read (2008) navajata, da je Agerer (2001) vrste uvrstil v skupino eksploracijskih tipov na kratke razdalje (SD ET), kar v našem primeru sovпада z vrsto *P. ostracoderma* in je v nasprotju z vrsto iz rodu *Trichophaea* sp., kjer smo opazili posamezne rizomorfe (Slika 21). Rizomorfi pri vrsti iz rodu *Trichophaea* sp. so morda posledica napačne anatomske-morfološke identifikacije, saj lahko gre le za skupke hif. Možno je tudi, da je napaka posledica molekulskih analiz, saj so nekatere sekvence po primerjavi BLASTn (Altschul in sod., 1990) imele Query cover okrog 85 %, kar ne zagotavlja podobnosti niti na nivoju rodu (os. kom. Marko Bajc) in bi posledično lahko takšne sekvence uvrstili le v skupino neidentificiranih ektomikoriznih gliv. Podobno velja za nekatere ektomikorizne vrste iz poskusa iz rodu *Pulvinula* sp. Za rod *Pulvinula* nismo uspeli narediti

filogenetskih analiz zaradi premajhnega števila vrst v spletnih bazah GenBank (Genbank, 2014) in UNITE (Köljalg in sod., 2013). Molekulske analize pa so pokazale ujemanje sekvenc po analizi BLASTn (Altschul in sod., 1990) z vrsto *Pulvinula constellatio* (identičnost in Query cover nad 96 %). Amicucci in sod. (2001) so opisali omenjeno ektomikorizno vrsto, za katero menijo, da zelo pogosto tvori ektomikorizo z rastlinami, ki imajo sicer razvito ektomikorizo z vrstami iz rodu *Tuber* sp. Poleg vrste *Pulvinula constellatio* tvori mikorizo v bližini vrst iz rodu *Tuber* sp. tudi vrsta *Sphaerospora brunnea* (Amicucci in sod., 2001), ki je sicer v tesnem stiku z vrsto *Trichophaea woolhopeia* (Tedersoo in sod., 2006). Obe vrsti smo po poravnavi sekvenc iz poskusa s sekvencami iz spletnih baz z BLASTn (Altschul in sod., 1990) zasledili tudi v poskusu (rezultati niso prikazani). Opazili smo, da se vsi trije rodovi (*Tuber* sp., *Pulvinula* sp. in *Trichophaea* sp.) v poskusu v klimatizirani komori (CR+ in CR-) pojavljajo skupaj (Preglednica 17).

5.2 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA VRSTNO PESTROST EKTOMIKORIZNIH GLIV

Temperatura in vlaga imata direkten vpliv na rast in respiracijo mikroorganizmov v tleh (Deckmyn in sod., 2014). Poleg obeh dejavnikov imajo na ektomikorizne (ECM) glive pomemben vpliv tudi hranila in CO₂, ki vplivajo na rastlino (Ekblad in sod., 2013). Vpliv temperature lahko poveča respiracijo ECM gliv (Hawkes in sod., 2008) ali pa se mikorizne glive prilagodijo, kot poročajo Malcolm in sod. (2008). Vpliv temperature na glivnega partnerja je povezan tudi preko rastline, s katero je gliva v simbiozi. Pri povišani temperaturi lahko rastline zaradi zaprtja listnih rež zmanjšajo proces fotosinteze, posledično nastaja manj ogljikovih hidratov, ki jih rastline izmenjujejo z glivami (Plain in sod., 2009). Vpliv manj ugodnih podnebnih razmer ob koncu vegetativne sezone, kot so nižje temperature, nižja vlaga v zraku in substratu in znižana moč svetlobnega obsevanja, so opazili tudi Taylor in sod. (2003). Vpliv suše in povišane temperature na pojavljanje ektomikoriznih gliv so dokazali tudi Herzog in sod. (2013) pri ektomikorizni glivi *C. geophilum*. Na podlagi identificiranih ET v tleh, lahko sklepamo o ektomikoriznih združbah, ki se pojavljajo v določenem okolju v tleh (Peay in sod., 2011), poleg tega pa lahko glede na njihovo prisotnost sklepamo na rastišče, ki ga rastlina naseljuje, na sestavo tal v talnem profilu in na druge dejavnike, in vplivajo na to, kateri ET se bodo v danem okolju razvili.

Glede na temperature zraka, ki so jim bile sadike izpostavljene, smo opazili največjo pestrost ektomikoriznih gliv v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin (Preglednica 19), kar je v nasprotju z ugotovitvami iz diplomske naloge (Štraus in sod., 2011), kjer smo večjo pestrost ECM gliv identificirali v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin. Kljub temu, da smo v obeh tretmajih v klimatizirani komori identificirali enako število ektomikoriznih tipov, so indeksi vrstne pestrosti v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) višji od tretmaja s hlajenjem korenin (CR+), kar je lahko le posledica nižjih temperatur v substratu. Shanon-Weaverjev indeks je v rastlinjaku (GH) višji od tretmaja zunaj, vendar pa sta ostala dva indeksa (bogastvo vrst in uravnoteženost) višja v tretmaju zunaj, kljub temu, da smo v obeh tretmajih identificirali po tri različne tipe ektomikorize. Na vrstno pestrost ektomikoriznih gliv lahko vpliva tudi dostopnost dušika v tleh (Lilleskov in sod., 2002). Hobbie in Högberg (2012) poročata, da lahko dostopnost dušika v tleh vpliva na prisotnost različnih eksploracijskih tipov in s tem na diverzitetu mikoriznih gliv v tleh. Agerer in sod. (2012) poročajo da vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ glive *Ramaria* sp. sovpadajo z globino talnega profila, kjer se razraščajo hife. Michelsen in sod. (1998) poročajo, da so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ tesno povezane z prisotnostjo in vrsto mikorize pri rastlinah. Buée in sod. (2005) so ugotovili, da je pestrost ECM vrst v pozitivni korelaciji z vodnim potencialom v tleh v kontrolnem poskusu glede na razredčen bukov sesto.

Pojavljanje ektomikoriznih (ECM) gliv se spreminja s povečanimi koncentracijami CO₂ v zraku, prav tako mikorizne glive razvijejo več rizomorfov in zunaj koreninskega micelija (Smith in Read, 2008). Večji delež ECM korenin pri povišani koncentraciji CO₂ v zraku smo dokazali tudi v tretmajih CR+ (10%), CR- (11%) in GH (11%) v primerjavi z OUT (5%), kjer je bila koncentracija CO₂ v zraku normalna. Poleg tega smo v omenjenih tretmajih največkrat identificirali vrste iz rodu *Scleroderma* (47,6% v CR+, 45,6% v CR-, 84,7% v GH), ki razvijejo obsežen zunajkoreninski preplet hif in rizomorfov v primerjavi s tretmajem zunaj, kjer smo večkrat identificirali vrste iz rodu *Tuber* (45,6% vrst iz rodu *Tuber* in 32,6% vrst iz rodu *Scleroderma*), ki ne razvijejo zunajkoreninskega micelija. Rygiiewicz in sod. (1997) poročajo o povišani produkciji ektomikoriznih gliv pri boru (*Pinus ponderosa*) pri povišanih koncentracijah CO₂, medtem ko se življenjska doba korenin ne spremeni. Albertson in sod. (2005) so naredili analizo številnih morfoloških in fizioloških parametrov pri ektomikoriznih glivah pod vplivom povišane koncentracije CO₂ in ugotovili, da je odziv ECM gliv za 13 % višji kot pri arbuskularnih mikoriznih (AM) glivah, zato bo vpliv globalnega dviga

koncentracij CO₂ na gozdne ekosisteme, kjer prevladujejo predvsem ECM glive, precej večji kot v ekosistemih, kjer prevladujejo AM glive.

Poleg tega, da so ektomikorizne glive na koreninskih vršičkih gostiteljskih rastlin, jih lahko izoliramo tudi iz substrata, v katerem je posajena sadika z razvito ektomikorizo, kar smo dokazali že v diplomski nalogi (Štraus, 2010). Veliko pestrost mikroorganizmov v substratu smo potrdili tudi tokrat z analizo DGGE. Metodo DGGE so za ugotavljanje pestrosti mikroorganizmov (gliv in bakterij) v substratu uporabili številni znanstveniki (Kowalchuk in Smit, 2004; Nakatsu in sod., 2000; Smalla in sod., 2007). Največja pestrost gliv je bila v tretmaju zunaj, verjetno zato, ker je bil sistem odprt in izpostavljen naravnemu okolju, zato je bila verjetnost vnosa spor gliv in drugih mikroorganizmov v rizotrone večja.

Čeprav na osnovi analiz DGGE neposredno ne moremo sklepati o vrstah, lahko glede na pogostost in intenzitete lis, njihove razlike med tretmaji in rezultate PCA, identificiramo ključne lise za posamezne tretmaje in tudi tiste, ki se pojavljajo pri vseh. Lise 38,0 %, 46,5 %, 52,2 % in 54,6 % se v izrazitejšem deležu pojavljajo pri vseh štirih tretmajih in najverjetneje predstavljajo vrste, katerih prilagodljivost jim zagotavlja kompetitivnost pri pogojih vseh štirih tretmajev. Zlasti pomembna je vrsta, ki jo predstavlja lisa 54,6 %, saj je bila ta lisa celokupno najbolj pogosta in imela tudi najvišjo povprečno intenziteto. Predvidevamo, da bi lisa 54,6% lahko predstavljala vrsto *Scleroderma* sp., saj je le-ta bila najpogostejše ugotovljena tudi v analizi ugotavljanja nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje). Podobno nam rezultati analize DGGE nakazujejo, da pogoji tretmaja CR+ pozitivno vplivajo na vrsto, ki jo predstavlja lisa pri 63,8 %, saj je njen delež tako kvalitativno kot kvantitativno v tretmaju CR+ izrazito višji kot pri drugih tretmajih in je za tretma CR+ tudi dominantna, saj se pojavlja v največjem številu vzorcev in z najvišjo povprečno intenziteto. Tudi PCA analiza je izpostavila liso 63,8 % kot najbolj značilno za tretma CR+. Lisa 63,8 % bi lahko predstavljala vrsto *Tuber* sp. Za tretma sta dodatno značilni še lisi 59,8 % in 62,5 %. Za tretma OUT smo ugotovili največjo pestrost in tudi največje število unikatnih lis, kar je verjetno posledica odprtosti sistema, zaradi česar je bil vnos gliv in drugih mikroorganizmov iz okolja večji, ki pa se povečini ne pojavljajo pri velikemu številu vzorcev in/ali visoki povprečni intenziteti in jih zato ne moremo obravnavati kot izrazito pomembne ali značilne za ta tretma. Kot ključne za tretma OUT smo na osnovi analize PCA in rezultatov »band matching« identificirali lise

45,5 %, 15,5 % in 26,7 %. Lise, ki so dominantne za režima CR- in GH, so hkrati tudi tiste, ki se v izrazitejšem deležu pojavljajo pri vseh štirih tretmajih. Za ugotovitev dejanske identitete vrst, ki jih ključne in zgoraj omenjene lise predstavljajo, bi bilo potrebno izvesti še dodatne molekulske analize. Iz ugotovljenega pa lahko z veliko gotovostjo trdimo, da je hlajenje korenin dejavnik, ki je povzročil, da je vrsta, ki jo predstavlja lisa 63,8 % v tretmaju CR+ postala dominantna. Potrebno je tudi poudariti, da rezultati analize DGGE ne zajemajo zgolj mikoriznih glive, pač pa vse žive, dormantne in vsaj v določeni meri tudi odmrle glive, katerih DNA smo uspeli izolirati iz vzorcev prsti. Zato se sestava glivne združbe in medsebojna razmerja predstavnikov glede na DGGE analizo ne ujemajo povsem z rezultati drugih analiz, ki so bile osredotočene zgolj na koreninski sistem sadik.

5.3 VPLIV TEMPERATURE NA RASTNE PARAMETRE PRI BUKVI

Temperatura tal vpliva na delovanje ekosistema z vplivom na kemične, fizikalne in biološke procese (Ostonen in sod., 2007). V nalogi smo dokazali, da temperatura tal značilno vpliva na biomaso korenin in poganjkov tri letnih sadik, na premer stebela, specifično dolžino korenin in specifično gostoto korenin (Preglednica 15, Preglednica 14). Največjo biomaso smo opazili pri sadikah iz tretmaja z dodatnim hlajenjem korenin (CR+), kjer je bila temperatura na globini -20 cm primerljiva s poletno temperaturo tal na globini -20 cm na območju provenience, od koder izvirajo sadike iz poskusa. Povečana temperatura tal za 3-3,45 °C pri sadikah brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) v klimatizirani komori je povezana z manjšo biomaso korenin in poganjkov. Na povečano biomaso korenin in poganjkov sadik v klimatizirani komori in rastlinjaku v primerjavi s tretmajem zunaj je verjetno vplivala tudi visoka koncentracija CO₂ v zraku. O povečani biomasi, kot posledici povišanih koncentracij CO₂ pri sadikah bukve poročajo številni avtorji (Bruhn in sod., 2000; Epron in sod., 1996; Kohen in sod., 1993; Overdieck in sod., 2007), vendar o vplivu CO₂ težko govorimo, kljub izmerjenim povišanim koncentracijam, saj so vrednosti fluksov (respiracija in fotosinteza) okrog 0 μmol CO₂ m⁻² mesec⁻¹. Zmanjšana biomasa v tretmaju s povišano temperaturo tal je posledica zmanjšanje biomase olesenelega lesa, kar lahko vidimo pri premeru stebel, saj biomasa listov v obeh tretmajih v klimatizirani komori ostaja bolj ali manj enaka. Mellilo in sod. (2011) so dokazali nasprotno, saj so dokazali vnos ogljika v olesenela tkiva dreves v poskusu s 7-letnim segrevanjem tal v mešanem listnatem gozdnem ekosistemu. Overdieck in

sod. (2007) so prav tako dokazali povečan premer stebela, višine in biomase stebela pri sadikah bukve, ki so bile 2,5 leta izpostavljene višjim temperaturam. Po drugi strani pa so Wayne in sod. (1998) pri sadikah rumene breze različnih populacij ugotovili 73 % zmanjšanje biomase pri povišanju temperature za 5 °C in pri naravnih koncentracijah CO₂ in 43 % zmanjšanje biomase pri povišanih koncentracijah CO₂. Saxe in sod. (2001) poudarjajo, da je vpliv na odziv dreves na temperaturo v okolju omejen na genetsko raven, kot so vrste ali provenience, zato odzivov ne moremo posploševati.

Nizka biomasa poganjkov (Preglednica 14) in korenin (Preglednica 15) sadik, ki so rastle v tretmaju zunaj, je verjetno povezana s številnimi stresnimi dejavniki, ki so jim bile sadike izpostavljene. Nizke zimske temperature so lahko povzročile povečano odmiranje drobnih korenin, kar zahteva dodatne vire ogljika za proizvodnjo novih (Pregitzer in sod., 2000). Podaljšanje rastne sezone pri sadikah v klimatizirani komori in v rastlinjaku je lahko povezano v boljšo dostopnostjo dušika zaradi višjih temperatur, kar prispeva k različni biomasi med sadikami, ki so bile zunaj od sadik v zaprtih prostorih, zaradi večje produktivnosti in skladiščenja ogljika pri sadikah v rastlinjaku in klimatizirani komori (Melillo in sod., 2011). Povišane temperature v daljšem časovnem obdobju lahko značilno vplivajo na stopnjo ontogenetskega razvoja, listno površino in biomaso (Morison in Lawlor, 1999).

Glede na biomaso podzemnega dela, se rezultati destruktivne analize (Preglednica 15) kot tudi nedestruktivne analize (Preglednica 13) iz naloge skladajo s številnimi raziskavami. Bruhn in sod. (2000) so pri bukvi dokazali, da se razporejanje snovi v korenine zmanjša s povečano temperaturo. Zhou in sod. (2011) so dokazali, da 6-letno segrevanje tal za 5 °C v zmernih gozdovih vpliva na zmanjšanje skupne biomase korenin (živih in mrtvih korenin) za 42,5 % in žive biomase korenin za 62 %, in da segrevanje nima vpliva na koncentracijo ogljika v ogljikovih komponentah (saharoza, škrob, celuloza, hemiceluloza in lignin) pri združenih vzorcih korenin (korenine vključene v raziskavo niso bile ločene po vrstah). O negativnem vplivu na biomaso drobnih korenin zaradi segrevanja tal za 5 °C v času rastne sezone so poročali tudi Bronson in sod. (2008) in Melillo in sod. (2011). Po drugi strani pa nekateri raziskovalci dokazujejo obraten učinek. Pri 4-mesečnem segrevanju tal za 14,7-20,5 °C v poskusu s tremi različnimi drevesnimi vrstami sta Peng in Dang (2003) dokazala povečanje

biomase korenin, ki je bilo še posebej izrazito pri listopadnih vrstah (*Populus tremuloides* Michaux), medtem ko so King in sod. (1999) za isto vrsto (*Populus tremuloides*) dokazali le znatno povečanje biomase korenin v poskusu s segrevanjem tal, poleg tega pa so večji poudarek namenili dostopnosti dušika in s tem povezani povečani akumulaciji biomase. Poleg tega poročajo, da so povečano neto produkcijo dolžine korenin opazili na začetku poskusa, medtem ko so ob koncu zabeležili povečano umrljivost korenin. Rezultati temperaturnih raziskav velikokrat poročajo o povečani umrljivosti drobnih korenin zaradi vpliva povišanih temperatur tal in o vzporedni povečani produkciji novih korenin (Pregitzer in sod., 2000). Povečana umrljivost drobnih korenin pomeni večji vnos ogljika v tla (King in sod., 1999) hkrati pa so stroški vzdrževanja novih drobnih korenin visoki, kljub temu, da drobne korenine za rast in razvoj zahtevajo manj ogljika (Pregitzer in sod., 2002). Kakorkoli, biomasa korenin sama po sebi ni dovolj zanesljiv kazalec funkcionalnih lastnosti koreninskega sistema v smislu absorpcijskega organa (Hodge, 2004).

Temperatura tal ni značilno vplivala na razmerje med koreninami in poganjki (Slika 9). Podobne rezultate analiz so prikazali tudi Bruhn in sod. (2000) in Overdieck in sod. (2007) pri sadikah bukve, King in sod. (1999) pri trepetliki, Peng in Dang (2003) za tri od štirih borealnih drevesnih vrst in Wertin in sod. (2011) za rdeči hrast. Razmerje med koreninami in poganjki pri sadikah iz rastlinjaka je primerljivo s sadikami iz obeh tretmajev v klimatizirani komori, medtem ko je pri sadikah iz tretmaja zunaj nekoliko, čeprav statistično neznačilno povečano (Slika 9). Nižje razmerje med koreninami in poganjki pri sadikah iz rastlinjaka in klimatizirane komore je morda povezano z ontogenetskim razvojem, ki je lahko posledica segrevanja (Morison in Lawlor, 1999). Rastline navadno razvijejo več korenin, ko so majhne in mlade, kasneje pa investirajo v biomaso poganjkov (Weiner, 2004).

Temperatura tal vpliva na specifično dolžino korenin (SRL), ki je značilno povečana pri sadikah brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) v primerjavi s sadikami z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) (Preglednica 15). SRL v vseh tretmajih je primerljiv s povprečnimi vrednostmi SRL za sadike bukve (*Fagus sylvatica* L.) v naravnih sestojih, ki jih navajajo Ostonen in sod. (2007), Grams in sod. (2002) in Železnik in sod. (2007). Specifična dolžina korenin je parameter, ki predstavlja vlaganje v koreninski sistem, kjer je nižji SRL povezan z nižjimi stroški razvoja na enoto dolžine korenin (Eissenstat, 1992; Ostonen in sod., 2007; Ryser,

2006). Ostonen in sod. (2007) opisujejo SRL kot intenzivno strategijo dreves za pridobivanje mineralnih snovi, ki vključujejo prilagoditve korenin na morfološkem nivoju. Povečan SRL v našem poskusu je povezan z nižjo biomaso korenin v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin, medtem ko je skupna dolžina koreninskega sistema nekoliko nižja kot pri sadikah z dodatnim hlajenjem korenin in premer korenin ni značilno manjši (za 7,7 % vrednosti premera sadik z dodatnim hlajenjem korenin) (Preglednica 15). Ob predpostavki, da je gostota korenin obeh tretmajev v klimatizirani komori enaka, smo s pomočjo enačbe, ki jo navajajo Ostonen in sod. (2007), izračunali SRL za dolžino in premer in ugotovili, da razlika v SRL med tretmajema ne more biti vzrok razlik v dolžini korenin in premeru med tretmajema, saj delež premera in dolžine predstavljata le 17 % razliko. Ker so bile vrednosti SRL izračunane za celoten koreninski sistem, se lahko pojavijo razlike v dolžini osrednjega dela koreninskega sistema (> 2 mm) med tretmajema v klimatizirani komori, ki lahko značilno vplivajo na razlike v biomas, saj je ta del koreninskega sistema težji. Dejansko lahko pri sadikah z dodatnim hlajenjem korenin opazimo večjo dolžino osrednjega koreninskega sistema. Dodatna razlaga za razlike v SRL so morda spremembe v gostoti koreninskega tkiva, ki bi lahko pojasnile nižjo biomaso pri praktično enaki dolžini in premeru korenin. Pregitzer in sod. (2000) predvidevajo, da se morfolologija in kvaliteta tkiva lahko spreminjata zaradi vpliva temperature tal. Biomasa korenin in gostota tkiva sta povezana z anatomske lastnostmi korenin (Ryser, 2006). Ostonen in sod. (2007) so dokazali, da relativna gostota tkiva ni v korelaciji s premerom drobnih korenin in da je variabilnost relativne gostote tkiva drobnih korenin veliko bolj variabilna od premera. Da bi pojasnili vzrok zmanjšane biomase korenin, ki se odraža v višjih vrednostih SRL, bi morali opraviti še dodatne raziskave. Tako gostota tkiva kot premer korenin vplivata na dolžino in obrat drobnih korenin z vplivanjem na kroženje ogljika v tleh. McCormack in sod. (2012) so poročali, da višji SRL negativno vpliva na življenjsko dobo drobnih korenin, vendar statistično značilnih razlik med življenjsko dobo korenin in gostoto tkiva niso uspeli dokazati. Večje količine debelejših korenin (> 2 mm) omogočajo večjo dolžino korenin in tako vplivajo na kroženje ogljika v tleh.

Pri sadikah iz tretmaja brez dodatnega hlajenja korenin smo zabeležili podoben SRL kot pri sadikah v rastlinjaku. Pri sadikah rastlinjaka smo zabeležili najmanjši premer korenin (Preglednica 13, Preglednica 15) in najvišji delež drobnih korenin (Preglednica 15) glede na vse tretmaje v poskusu. Čeprav o višjih vrednostih SRL navadno poročajo za rastline, ki

rastejo na območjih z limitnimi koncentracijami hranilnih vrednosti (Ryser, 2006), in nižjih vrednostih SRL zaradi gnojenja tal (Ostonen in sod., 2007), je SRL lahko tudi kazalec povečanega pridobivanja hranil, ki omogoča lažje in hitrejše pridobivanje snovi iz razpoložljivih virov (Ryser, 2006). Kadar je vodni potencial v tleh ustrezen, povišane temperature tal omogočijo večjo dostopnost dušika zaradi hitrejših procesov mineralizacije dušika (Pregitzer in sod., 2000; Zhou in sod., 2011), kar lahko velja za tretma brez dodatnega hlajenja korenin in rastlinjak. Večja mineralizacija dušika v tleh je v negativni korelaciji z biomaso in nekromaso drobnih korenin (Zhou in sod., 2011), kar je lahko vzrok za zmanjšano biomaso korenin v toplih tleh (Bronson in sod., 2008). Kadar je v tleh dovolj dušika, rastlina v podzemni del razporeja manj ogljika, ki je sicer potreben za razvoj korenin, ki omogočajo privzem N (Melillo in sod., 2011).

Kljub temu, da so mnoge značilnosti listov pod vplivom fiziološkega stanja rastlin in okoljskih dejavnikov (Poethig, 1997), vpliv temperature tal ni opisan. Zmanjšanje specifične površine korenin (SLA) v klimatizirani sobi in rastlinjaku je lahko povezano s povišanimi koncentracijami CO₂ (Preglednica 14). Zmanjšanje SLA je lahko posledica nestrukturnih ogljikovih hidratov, ki nastanejo, kadar fiksacija ogljika preseže porabo ogljika (Pritchard in sod., 1999). Way in Oren (2010) poročata, da povečana temperatura ne vpliva na SLA širokolistnih vrst. Na drugi strani pa Dang in Cheng (2004) poročata o vplivu povišane temperature tal za 25 °C na SLA pri širokolistnih vrstah in pri borealnih drevesnih vrstah iglavcev. Večje število listov na rastlino in skupno listno površino pri sadikah v klimatizirani komori glede na sadike v rastlinjaku in tretmaju zunaj je morda posledica višjih koncentracij CO₂ v zraku (Pritchard in sod., 1999). Bukev je bolj nagnjena k stimulaciji asimilacije CO₂ zaradi nizke stomatalne in notranje prevodnosti CO₂ (Epron in sod., 1996). Poleg tega lahko bukev vlaga asimilirane ogljikove hidrate v sekundarne liste, ki se razvijejo v zgodnjem delu poletja in delujejo kot ponor (Epron in sod., 1996), kar so dokazali tudi El Kohen in sod. (1993) pod vplivom CO₂. Povečano število listov zaradi sekundarne rasti, lahko v veliki meri prispeva na povečano povprečno površino listov na rastlino (Epron in sod., 1996). Omenjen vpliv CO₂ je verjetno povezan s konstantno svetlobo tekom dneva in rastjo sadik, kar je povezano z visoko fenološko plastičnostjo bukve (Vitasse in sod., 2010). Da bi dokazali vpliv povišanih koncentracij CO₂ na parametre pri listih, bi morali narediti še dodatne analize. Overdieck in sod. (2007) so pri sadikah bukve dokazali, da temperatura ali CO₂ ne vplivata na

število listov. Nižje razmerje listne površine pri sadikah v klimatizirani komori je lahko povezano s tem, da je pri povišani koncentraciji CO₂ v zraku potrebno manj listne površine za proizvodno določene količine stebelnega tkiva (Pritchard in sod., 1999). Bruhn in sod. (2000) poročajo, da se specifična listna površina (SLA) in razmerje listne površine (LAR) zmanjšata kot odgovor na povečane koncentracije CO₂ pri sadikah bukve. Pri sadikah brez dodatnega hlajenja korenin smo opazili vpliv temperature tal na razmerje listne površine (LAR), vendar razlika ni statistično značilna. Vpliv temperature na LAR so opisali Bruhn in sod. (2000) pri dveh proveniencah bukve na Danskem in Overdieck in sod. (2007) pri provenienci Heide in Altmarkt, vendar rezultati ne sovpadajo z našimi.

5.4 AKTIVNOST KISLE FOSFATAZE (SBP) PRI EKTOMIKORIZNIH GLIVAH

V nalogi smo dokazali, da je pojavljanje kisle fosfataze (SBP) različno pri različnih eksploracijskih tipih (Slika 27, Preglednica 21), kot so dokazali tudi Alvarez in sod. (2012) na primeru eksploracijskega tipa na dolge (LD ET) in kratke (SD ET) razdalje. V naše analize smo poleg LD ET in SD ET vključili tudi eksploracijski tip na srednje razdalje (MD ET) in kontaktni eksploracijski tip (CT ET). CT ET in SD ET se med sabo ne razlikujeta glede pojavljanja SBP. Oba imata encime večinoma na površini ektomikoriznega plašča, saj CT ET nimajo izhajajočih elementov, medtem ko so pri SD ET izhajajoči elementi redke hife. Alvarez in sod. (2005; 2012) predvidevajo, da so encimi kislih fosfatov pri SD ET in CT ET večinoma v Hartigovi mreži, kjer so komponente fosforja vezane v polifosfatne komplekse, ki služijo kot rezervna zaloga fosforja za čas, ko le-ta postane v okolju hranilo v pomanjkanju. Na drugi strani pa rastlina razvije simbiozo tudi z morfotipi oziroma eksploracijskimi tipi ektomikoriznih gliv, ki razvijejo obsežen preplet hif in rizomorfov v substratu, ki jim omogočajo dostop do tako imenovanih žepov v tleh, ki so bogata s hranili (Agerer, 2001). Omenjeni tipi ET (LD ET in MD ET) imajo aktivne SBP centre večinoma razporejene na ektomikoriznem plašču oziroma na izhajajočih elementih, kot so hife in rizomorfi, kar smo dokazali tudi v svoji raziskavi (Preglednica 21, Slika 27), ki so v stiku z okoliškim substratom in služijo predvsem za privzem fosforja iz substrata in transport polifosfatov do gostiteljske rastline (Cairney, 2011). Kljub temu Alvarez in sod. (2012) poudarjajo, da kisle fosfataze niso edini encimi, vključeni v razgradnjo polifosfatov v območju Hartigove mreže, saj so prisotni še drugi encimi, kot so ekso- in endopolifosfataze ter alkalne fosfataze, zato je razmerje med

razporejanjem kislif fosfataz in zalogami fosforja, ki jih omogoča mikorizna gliva, oziroma med fosforjem, ki je transportiran do gostiteljske rastline, potrebno še bolj podrobno raziskati. Kljub temu so Alvarez in sod. (2012) dokazali značilen vpliv eksploracijskih tipov na koncentracijo fosforja tako v koreninah kot tudi v nadzemnem delu, zato je lahko sklepamo na to, da je lokacija kisle fosfataze v ektomikoriznem tkivu povezana z njeno funkcijo razgradnje založnih oblik fosforja oziroma vezave in transporta fosfatnih oblik iz substrata (Cairney, 2011).

Mnogi avtorji dokazujejo, da imajo tako biotski (Criquet in sod., 2004) kot abiotski dejavniki (Alvarez in sod., 2005; Buee in sod., 2005; Criquet in sod., 2004) vpliv na delovanje kisle fosfataze, zato smo v nalogi želeli preveriti tudi vpliv temperature na pojavljanje oziroma delovanje kisle fosfataze (SBP). Predpostavili smo, da bo encimska aktivnost SBP največja v rastlinjaku (20,1 °C), kjer smo pričakovali največjo povprečno površino intenzitete maksimalne fluorescence (MIF) in najmanjšo v tretmaju zunaj (10,2 °C). Vendar v poskusu nismo dokazali značilnih razlik v pojavljanju SBP pri različnih temperaturah (Slika 28, Preglednica 21). Najnižna srednja vrednost povprečne površine maksimalne intenzitete fluorescence je bila izmerjena v rastlinjaku, kjer so bile temperature najvišje, kar pomeni, da je bila aktivnost encimov v tem primeru najnižja glede na ostale tretmaje. Baghel in sod. (2009) navajajo, da je optimalna temperatura za delovanje kisle fosfataze ektomikorizne glive *Cantharellus tropicalis* 40 °C, medtem ko Criquet in sod. (2004) ugotavljajo, da sta temperatura in aktivnost encimov v povezavi, vendar je aktivnost kisle fosfataze zmanjšana med julijem in septembrom. Buée in sod. (2005) ter Tibbett in Cairney (2007) so dokazali ravno nasprotno, da je pojavljanje encimov in encimska aktivnost kisle fosfataze povečana v zimskem času, kar bi lahko povezali z visokimi srednjimi vrednostmi v klimatizirani komori v našem poskusu. Vpliv temperature na aktivnost kisle fosfataze v našem poskusu (*in vivo*) je lahko manjši glede na ostale raziskave, ki so bile izvedene v *in vitro* sistemih, saj substrat v katerem se razraščajo mikorizne glive zmanjša neposreden vpliv temperature.

5.5 IZOTOPSKA SESTAVA $\delta^{15}\text{N}$ IN $\delta^{13}\text{C}$ SADIK BUKVE IN MIKORIZNIH GLIV ODRAŽA STANJE V EKOSISTEMU

5.5.1 Vzorci $\delta^{15}\text{N}$

Z analizami izotopske sestave ^{15}N in ^{13}C smo želeli preveriti, kako različne temperature, ki so jim bile sadike izpostavljene tri leta, vplivajo na kroženje N in C med rastlino in njenim glivnim partnerjem. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ listov so najnižje v vseh tretmajih glede na ostale kompartmente (Preglednica 23), kar pomeni, da so listi najbolj osiromašeni, kar je pričakovano, saj prejemajo osiromašen ^{15}N tako od mikoriznih gliv, kot od korenin. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ listov in substrata odražajo dinamiko dušika v gozdnih sistemih, kar so dokazali številni raziskovalci (Amundson in sod., 2003; Hobbie in Colpaert, 2003; Hobbie in Högberg, 2012; Michelsen in sod., 1998). Mikorizne korenine sadik v vseh tretmajih skupaj so ^{15}N obogatene v primerjavi z nemikoriznimi koreninami, kar je verjetno posledica privzemanja različnih oblik dušika iz substrata, kar sta dokazala tudi Hobbie in Colpaert (2003). Mikorizne glive oskrbujejo rastline z organskimi oblikami dušika, ki vsebujejo več težjega izotopa dušika, kot jih imajo sicer rastlinam dostopne anorganske oblike, ki jih rastline privzemajo neposredno iz tal (Hobbie in Colpaert, 2003; Hobbie in Högberg, 2012). Poleg tega, da mikorizne glive privzemajo obogatene oblike dušika iz tal, jih tudi vgrajujejo v svoj organizem, medtem ko lažje oblike transportirajo rastlini. Posledično so stebela rastlin ^{15}N osiromašena v primerjavi z mikoriznimi glivami in listi, ki imajo kot zadnji člen v transportni verigi nižje vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ kot stebela (Slika 29). Glede na nizke vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ substrata v vseh tretmajih bi lahko sklepali, da so v substratu prevladovali anorganski viri dušika, vendar zagotovo ne moremo trditi, ker nismo opravili podrobne analize tal. Na $\delta^{15}\text{N}$ substrata sicer vplivajo tudi mikorizne glive kot sta dokazala Hobbie in Coalpaert (2003), kjer je bil perlit v tretmaju s prisotnimi mikoriznimi rastlinami obogaten za približno 2,4‰, v primerjavi z nemikoriznimi rastlinami.

Na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ listov lahko vplivajo tudi okoljski dejavniki, kot sta temperatura in padavine (Amundson in sod., 2003; Craine in sod., 2009). Visoke povprečne letne temperature lahko povečajo $\delta^{15}\text{N}$ vrednosti listov, kar smo opazili tudi v našem poskusu, kjer so listi iz tretmaja zunaj (-0,46 ‰) in iz rastlinjaka (-1,63 ‰) bolj obogateni kot listi sadik iz klimatizirane komore (med -3,05 ‰ in -3,51 ‰) (Preglednica 23, Slika 29). Kljub temu bi

pričakovali, da bodo listi v rastlinjaku obogateni glede na liste v tretmaju zunaj, saj so temperature višje. Glede na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ stebela, ki je bolj obogateno pri sadikah zunaj (1,30 ‰) kot v rastlinjaku (0,98 ‰), bi lahko sklepali, da so sadike iz tretmaja zunaj morda bolj vlagale v razvoj stebela kot v liste, vendar meritve premera stebel kažejo nasprotno (premer stebel zunaj: 3,51 mm, premer stebel v rastlinjaku: 4,03 mm) (Preglednica 14). Drug razlog, ki bi lahko pojasnjeval, zakaj so listi tretmaja zunaj bolj obogateni kot iz rastlinjaka, so vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ substrata in nemikoriznih korenin, ki so bolj ^{15}N obogatene v tretmaju zunaj glede na rastlinjak (Preglednica 23). Tretji razlog, ki bi lahko pojasnil manjšo razliko med listi in substratom v tretmaju zunaj in v tretmaju v rastlinjaku (Preglednica 24) je prisotnost mikroorganizmov. Admundson in sod. (2003) sicer manjšo razliko med substratom in listi povezujejo s povišano temperaturo, zaradi katere pride do kompeticije med rastlino in mikroorganizmi, ki sprožijo proces denitrifikacije, ki obogati NH_4^+ in NO_3^- . V tretmaju zunaj so bile temperature najbolj variabilne izmed vseh tretmajev, kar je morda vplivalo tudi na procese mikroorganizmov v substratu.

Razliko med tretmaji v $\delta^{15}\text{N}$ je opaziti tudi pri mikoriznih koreninah, ki so najbolj obogatene v tretmaju zunaj (2,31 ‰), sledi tretma z dodatnim hlajenjem korenin (2,15 ‰), tretma brez dodatnega hlajenja korenin (1,61 ‰) in rastlinjak (1,52 ‰) (Preglednica 23, Slika 29). Vpliv temperature tal lahko opazimo med tretmajema v klimatizirani komori, kjer je razlika v temperaturi približno 4-5 °C, mikorizne korenine v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (2,15 ‰) so bolj obogatene kot iz tretmaja brez dodatnega hlajenja (1,61 ‰) (Preglednica 23). Razlika je lahko posledica temperature tal ali $\delta^{15}\text{N}$, kot so dokazali Agerer in sod. (Agerer in sod., 2012), da so mikorizne glive, ki pridobivajo N iz mineralnega dela tal, za 3 ‰ bolj obogatene od mikoriznih gliv, ki pridobivajo N iz mineralnega in organskega dela tal. Glede na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ substrata v primerjavi z $\delta^{15}\text{N}$ mikoriznih korenin, ki so tretmaju z dodatnim hlajenjem (-0,45 ‰) bolj negativne od tretmaja brez dodatnega hlajenja (0,79 ‰), lahko glede na raziskave Hobbie in Högberg (2012) sklepamo, da je bilo v substratu tretmaja z dodatnim hlajenjem korenin več mineralnih snovi kot v tretmaju brez dodatnega hlajenja korenin, kar pa ne velja za tretma zunaj, saj je substrat ^{15}N obogaten glede na substrat iz tretmaja z dodatnim hlajenjem korenin, prav tako so ^{15}N obogatene mikorizne korenine, za katere bi pričakovali, da bodo ^{15}N osiromašene.

Na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ vplivajo pojavljanje mikoriznih gliv in vrste mikorize (Lilleskov in sod., 2002; Michelsen in sod., 1998) ter eksploracijski tipi mikoriznih gliv (Hobbie in Agerer, 2010; Hobbie in Högberg, 2012), kar smo opazili tudi v temperaturnem poskusu. Eksploracijski tip na dolge razdalje (LD ET) (1,76 ‰) je ^{15}N obogaten v primerjavi z ostalimi ET v poskusu. Eksploracijski tip na kratke razdalje (SD ET) (-1,9 ‰) je najbolj ^{15}N osiromašen, kar je bilo dokazano tudi v drugih raziskavah (Hobbie in Agerer, 2010; Hobbie in Högberg, 2012). Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ za kontaktni eksploracijski tip (CT ET) v poskusu so zelo podobne vrednostim $\delta^{15}\text{N}$ LD ET in so ^{15}N obogatene, kar je v nasprotju z drugimi raziskavami (Hobbie in Högberg, 2012), kjer je CT ET v skupini eksploracijskih tipov, ki so bolj osiromašeni glede na LD ET ali MD ET. Razlog zato bi lahko bil predvsem substrat. Kontaktni eksploracijski tip v našem poskusu je bila ektomikorizna gliva iz rodu *Tuber*, za katerega so Buee in sod. (2007) dokazali, da ima visoke vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ ravno zato, ker primarno kolonizira mineralna tla v naravi. Opazili smo tudi razlike med tretmaji, kjer za LD ET velja, da je najbolj ^{15}N obogaten v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (2,85 ‰), sledi tretma brez hlajenja korenin, rastlinjak in tretma zunaj, ki je najbolj ^{15}N osiromašen (0,77 ‰) (Preglednica 23). Za CT ET velja, da je najbolj ^{15}N obogaten v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (2,17 ‰), sledi tretma brez hlajenja korenin, tretma zunaj in rastlinjak, ki je najbolj ^{15}N osiromašen (0,72 ‰). V vseh tretmajih razen v tretmaju zunaj, je CT ET ^{15}N osiromašen, glede na LD ET, kot prikazujejo drugi avtorji (Hobbie in Agerer, 2010; Hobbie in Högberg, 2012). Pri eksploracijskem tipu na srednje razdalje (MD ET) smo opazili, da je ^{15}N obogaten v poskusu brez dodatnega hlajenja (0,37 ‰), glede na poskus z dodatnim hlajenjem (-0,74 ‰).

Z analizami $\delta^{15}\text{N}$ lahko dobimo vpogled v podzemni del sistema, ki je sicer očem neviden: vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ odražajo sestavo substrata v tleh, tudi v talnem profilu, prav tako dajejo pomembno informacijo o ektomikoriznih glivah in obliki dušika, ki ga privzemajo iz tal in osiromašenega transportirajo do listov rastlin, ki so kot končni prejemnik v transportni verigi vedno ^{15}N osiromašeni glede na druga tkiva v transportnem procesu, razen če vmes posežejo drugi dejavniki, kot so temperatura, padavine ali nenazadnje vpliv človeka, ki lahko s svojim delovanjem močno spremeni procese v gozdnih tleh. Pomembno vlogo imajo tudi eksploracijski tipi ektomikoriznih gliv, ki z razraščanjem zunaj koreninskega micelija omogočajo privzem hranilnih snovi iz širšega področja v tleh in tako vplivajo na dostopnost

hranil iz tako imenovanih žepov v tleh, ki jih rastline s koreninskim sistemom ne morejo doseči.

5.5.2 Vzorci $\delta^{13}\text{C}$

Mikorizne glive so glede na liste v vseh tretmajih razen v rastlinjaku ^{13}C obogatene, kar je posledica transporta ogljikovih komponent od listov do mikoriznih gliv (François Le in sod., 2013; Hobbie in Colpaert, 2004; Zeller in sod., 2007). Mobilne oblike ogljika (sladkorji in škrob) v listih so ^{13}C obogatene glede na nemobilne oblike (lignin in lipidi), kar pomeni, da je tkivo, ki je najbolj oddaljeno od vira C, bolj ^{13}C obogateno od tkiva, ki je bližje. Vsebnosti $\delta^{13}\text{C}$ stebela so po vrednostih vmes med listi in mikoriznimi koreninami (Preglednica 23, Preglednica 24, Slika 29). Substrat je v vseh tretmajih ^{13}C obogaten glede na vse ostale kompartmente, vendar o njegovi sestavi ne moremo trditi na osnovi $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti, ker nismo opravili podrobne analize, vendar sovpadajo z rezultati Zeller in sod. (2007), ki navajajo, da so vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ v organskih tleh nižje kot v mineralnih tleh.

V tretmajih v klimatizirani komori in v rastlinjaku so nemikorizne korenine ^{13}C osiromašene glede na mikorizne korenine. Glede na to, da so med vsemi tretmaji vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ substrata bolj ali manj enake, medtem ko se vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ listov razlikujejo (razen med tretmajema v klimatizirani komori), je razlog potrebno iskati v mikoriznih glivah, kar pa ne moremo zagotovo trditi, saj bi potrebovali še podatke o fluksih CO₂ v podzemnem delu, ki se v poskusu gibljejo okrog 0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ mesec}^{-1}$ (os. kom. dr. Zachary Kayler).

Listi sadik iz klimatizirane komore so ^{13}C osiromašeni glede na liste iz rastlinjaka in tretmaja zunaj (Preglednica 23), kar je lahko tudi posledica visokih koncentracij CO₂ v zraku v klimatizirani komori in rastlinjaku glede na tretma zunaj. Enak vzorec $\delta^{13}\text{C}$ opazimo za steblo, mikorizne korenine in nemikorizne korenine v vseh tretmajih. Sadike tretmaja zunaj so bile izpostavljene zelo neugodnim pogojem, ki so bili od vseh tretmajev najbolj variabilni (največji razpon med min in max temperaturo, negativne temperature v tleh tekom zimske sezone, sneg, visoka zračna vlaga v času dežja). Rastline v neugodnih razmerah, kot je nizka temperatura ali nizko svetlobno sevanje, zmanjšajo tok ogljika od listov proti koreninam (Plain in sod., 2009), posledično so listi bolj ^{13}C obogateni, kar opazimo tudi v tretmaju zunaj.

glede na vse ostale tretmaje. Vpliv manj ugodnih podnebnih razmer ob koncu vegetativne sezone, kot so nižje temperature, nižja vlaga v zraku in substratu in znižana moč svetlobnega obsevanja, so Taylor in sod. (2003) opazili v sporokarpnih gliv kot nižje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$, kar je zopet povezano z zmanjšanim transportom ogljika od listov v podzemni del.

V klimatizirani sobi (600 – 700 ppm) in v rastlinjaku (550 ppm) smo izmerili povišane koncentracije CO₂, ki bi lahko imele vpliv na nizke vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ listov, vendar gre za zaprte sisteme, kjer je prezračevanje slabo in posledično rastline v procesu fotosinteze ves čas porabljajo enak CO₂, ki je tako že v osnovi osiromašen. Za bolj podrobno interpretacijo bi morali opraviti še izotopske analize CO₂ v zraku (os. kom. dr. Zachary Kayler).

Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ eksploracijskih tipov so v vseh poskusih bolj ali manj enake (-33,77 ‰ do -30,64 ‰) in ^{13}C osiromašene glede na vse mikorizne korenine skupaj, razen v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin (-33,65 ‰). Višje vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ mikoriznih korenin v ostalih tretmajih so lahko posledica $\delta^{13}\text{C}$ ostalih mikoriznih vrst, ki niso zajete v izotopsko analizo, vendar so bile vseeno identificirane (Slika 24, Preglednica 18).

Analize $\delta^{13}\text{C}$ omogočajo vpogled v kroženje ogljika v sistemu zrak-rastlina-gliva-tla. Sklepamo lahko na vpliv zunanjih dejavnikov, kot so sprememba temperature, intenziteta svetlobe, vlaga v tleh in substratu in nenazadnje letni čas, ki jim je rastlina trenutno izpostavljena. Vsi dejavniki se odražajo v izotopski sestavi ^{13}C , ki je ob ugodnih razmerah zaradi visokega deleža fotosinteze osiromašen, saj obogaten ^{13}C rastline iz listov transportirajo do mikoriznih gliv, ki ga vgrajujejo in tako širijo mikorizni preplet v tleh. Tako mikorizne glive ob ugodnih razmerah dobijo več ogljika, se posledično hitreje razraščajo v substratu in iščejo nove vire hranilnih snovi, ki jih v zameno za ogljik izmenjujejo z rastlinami.

5.5.3 Primerjava $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ vrednosti med tretmaji

Kot so ugotovili številni avtorji (Agerer in sod., 2012; Amundson in sod., 2003; Hobbie in Högberg, 2012; Plain in sod., 2009; Taylor in sod., 2003) je temperatura eden izmed dejavnikov, ki lahko vpliva na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ pri rastlinah in mikoriznih glivah. Ta

vpliv smo dokazali tudi v naši nalogi za liste, steblo in nemikorizne rastline (Slika 30). Razlike v listih opazimo med rastlinjakom (GH), tretmajem zunaj (OUT) in tretmajema v klimatizirani komori skupaj (CR⁺ in CR⁻), pri stebelu se vrednosti za rastlinjak in lopo združujejo v eno skupino, medtem ko se tretmaja iz klimatizirane komore združita v drugo. Omenjene razlike so lahko tudi odraz razlik v koncentracijah CO₂ v zraku, saj so vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ za klimatizirano komoro v vseh primerih najbolj negativne glede na rastlinjak in tretma zunaj. Za nemikorizne korenine bi lahko trdili, da se vsi štirje tretmaji ločijo med sabo, kar je zelo nenavadno, glede na to, da se mikorizne korenine ne ločijo, medtem ko nekateri avtorji (Hobbie in Högberg, 2012; Lilleskov in sod., 2002; Michelsen in sod., 1998) menijo, da obstajajo razlike med mikoriznimi rastlinami in vrstami mikoriznih gliv. Razlik med vrednostmi $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ substrata po pričakovanjih nismo opazili (Slika 31), saj je bil substrat ob začetku poskusa povsod enak. Njegova izotopska sestava bi se lahko spremenila tekom poskusa zaradi delovanja mikoriznih gliv ali drugih mikroorganizmov.

5.6 SKLEPI

Pri nalogi smo uspeli dokazati, da temperatura in povišana koncentracija CO₂ skupaj vplivata na vrstno pestrost ektomikoriznih gliv pri bukvi. Največ mikoriznih korenin smo identificirali v tretmajih brez dodatnega hlajenja korenin in v rastlinjaku, kjer je bila tudi povečana koncentracija CO₂. Manj mikoriznih korenin v tretmaju z dodatnim hlajenjem korenin bi lahko bila posledica nižje temperature tal. Poleg tega smo največ različnih tipov ektomikoriznih gliv opisali v klimatizirani komori. Opazili smo tudi, da se nekatere vrste pojavljajo v vseh tretmajih, medtem ko za druge to ne drži.

Pri nalogi smo želeli dokazati vpliv temperature na aktivnost hif. Z analizami encimske aktivnosti nismo uspeli potrditi hipoteze, da temperatura vpliva na pojavljanje na površino vezane fosfataze, vendar moramo poudariti, da je bil vpliv temperature morda lahko zmanjšan zaradi poskusa *in vivo* in možnosti prilagoditve delovanja encimov na temperaturne režime tekom izvajanja poskusa. Znano je, da ekspresija genov pri glivah poteka razmeroma hitro. Kljub neznačilnim razlikam smo opazili, da so bile srednje vrednosti povprečne površine maksimalne intenzitete fluorescence najnižje pri tretmaju v rastlinjaku, torej je bila aktivnost zaradi visokih temperatur lahko deloma zmanjšana.

Z analizami encimske aktivnosti pri različnih eksploracijskih tipih smo opazili značilne razlike pri pojavljanju encimov kisle fosfataze med vsemi eksploracijskimi tipi razem med eksploracijskim tipom na kratke razdalje in kontaktnim eksploracijskim tipom. Pri kontaktnem eksploracijskem tipu se encimi pojavljajo na mikoriznem plašču, pri eksploracijskem tipu na kratke in srednje razdalje se encimi pojavljajo pogosteje na mikoriznem plašču kot na izhajajočih elementih in pri eksploracijskem tipu na dolge razdalje se encimi pojavljajo tako na mikoriznem plašču kot tudi na izhajajočih elementih. Menimo, da je pojavljanje encimov pri različnih eksploracijskih tipih povezano s funkcijo, ki jo imajo v naravi.

Pojavljanje eksploracijskih tipov v naravi je verjetno povezano z njihovo funkcijo v tleh. Zato predvidevamo, da se eksploracijski tipi na dolge razdalje pri odraslih drevesih bolj pogosto pojavljajo na obrobem delu koreninskega sistema, kjer pridobivajo hranilne snovi, ki jih transportirajo v centralni del koreninskega sistema, ki je zastopan pretežno s kontaktnim eksploracijskim tipom, ki skladišči hranilne snovi za čas, ko jih bodo rastline potrebovale za rast in razvoj. Z razvojem mikorizne povezave med glivo in korenino se spremeni tip razraščanja in razporeditve korenin v tleh. Poleg tega mikorizne glive delujejo kot prepreka pred vdorom patogenih organizmov iz tal in pred toksičnimi snovmi in tako neposredno ščitijo korenine in tako podaljšujejo njihovo življenjsko dobo.

Z izotopskimi analizami ogljika in dušika pri mikoriznih rastlinah smo v nalogi dokazali, da mikorizne glive sodelujejo v procesu kroženja snovi. Z analizami vsebnosti izotopov $\delta^{13}\text{C}$ lahko sklepamo o zunanjih dejavnikih, kot so sprememba temperature, intenziteta svetlobe, vlaga v tleh, koncentracije CO₂ in drugo, saj vsi omenjeni dejavniki vplivajo na proces fotosinteze pri rastlinah, ki pa se odraža v izotopski sestavi ogljika v posameznih kompartmentih tako rastline kot glive, medtem ko vsebnosti $\delta^{15}\text{N}$ odražajo stanje dušika v tleh.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Spremembe temperature v gozdnih ekosistemih so lahko globalne narave, kot predvidevajo prevladujoči scenariji klimatskih sprememb ali lokalne antropogene narave, ko zaradi človekovih dejavnosti prihaja do sprememb rabe tal in razgalitve gozdnih tal, ki posledično absorbirajo več toplote. Poglavitni dejavnik neto primarne proizvodnje v gozdnih tleh so organizmi v mikorizosferi, predvsem korenine in mikorizne glive kot ključna komponenta gozdnih talnih ekosistemov. V raziskavi smo želeli ugotoviti vpliv temperature zraka in tal tako na sadike bukve kot tudi na ektomikorizne glive. Poskus smo zastavili na enoletnih sadikah bukve *Fagus sylvatica* L., ki smo jih posadili v steklene rizotrone (50x30x2 cm) pri štirih različnih temperaturnih razmerah: v klimatizirani komori z dnevno temperaturo 15-20 °C smo zastavili dva tretmaja, tretma brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) in tretma z dodatnim hlajenjem korenin za 4-5 °C (CR+), tretma v rastlinjaku s povišanimi temperaturami zraka (GH), kjer je dnevna poletna temperatura dosegla tudi 47 °C in tretma zunaj (OUT), kjer so bile sadike izpostavljene naravnim temperaturam zraka. Na sadikah smo v času trajanja triletnega poskusa izvajali nedestruktivne analize korenin z mesečnim slikanjem, ob koncu pa smo opravili destruktivno analizo celotne rastline. Ugotovili smo, da se je dolžina korenin v vseh tretmajih povečala, prav tako velja za povprečni premer korenin. Največji delež drobnih korenin, več kot 98% in najmanjši povprečni premer korenin so imele sadike v rastlinjaku. Koreninske sisteme smo pregledali s pomočjo lupe, jih skenirali s skenerjem za nadaljnje analize korenin in jih ločili na mikorizne in nemikorizne korenine. Delež mikoriznih korenin je bil v tretmajih CR+, CR- in GH med 10,3% in 11,4%, medtem ko je bilo v tretmaju zunaj za polovico manj mikoriznih korenin (5%). Delež nemikoriznih korenin je bil zelo visok v vseh tretmajih, najvišji, kar 95% pa je bil v tretmaju zunaj. Mikorizne korenine smo opisali z anatomsko-morfološko metodo in nadaljevali z molekulskimi in filogenetskimi analizami identifikacije ektomikoriznih gliv. Tudi tokrat smo dokazali, da le anatomsko-morfološka metoda identifikacije mikoriznih gliv ni najbolj primerna in da je nujno potrebno nadaljevati z molekulskimi in filogenetskimi analizami, saj smo z anatomsko-morfološko metodo opisali 114 tipov ECM, od tega le 2 vrsti do rodu (35-krat *Scleroderma* sp., 4-krat *Tuber* sp.) in eno do vrste (*Cenococcum geophilum* Fr.). Ostalih

83 ECM tipov nismo uspeli identificirati niti do rodu. Z molekulskimi analizami smo uspešno identificirali 114 ECM tipov do rodu (34-krat *Scleroderma* sp., 56-krat *Tuber* sp., 13-krat *Trichophaea* sp., 9-krat *Pulvinula* sp., 1-krat *Peziza* sp in 1-krat *Hebeloma* sp.). Kljub nadaljevanju identifikacije do vrste s filogenetskimi analizami vrst iz rodu *Scleroderma* in *Tuber* nismo uspeli identificirati do vrste. Prav tako nismo identificirali vrst iz rodu *Trichophaea* in *Pulvinula*, ker je bilo v spletnih bazah premalo sekvenc. Uspešno smo identificirali vrsto *Hebeloma mesophaeum* (P.) Q. in *Peziza ostracoderma* K. Za koreninske sisteme in nadzemni del sadik smo izračunali najbolj pogosto uporabljene indekse rasti (SRL, SLA, LAR), s katerimi smo želeli dodatno opisati vpliv temperatur in povišanih koncentracij CO₂ v zraku. Dokazali smo, da temperatura tal vpliva na specifično dolžino korenin (SRL), ki je značilno povečana ($p < 0,05$) pri sadikah brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) v primerjavi s sadikami z dodatnim hlajenjem korenin (CR+). Značilne razlike ($p < 0,001$) v zmanjšani specifični površini listov (SLA) pri sadikah v klimatizirani sobi in v rastlinjaku bi lahko bile posledica povišanih koncentracij CO₂ v zraku. Prav tako smo opazili značilno ($p < 0,001$) zmanjšanje razmerja listne površine (LAR) med CR+ in GH, ter CR+ in OUT, medtem ko se CR- ne razlikuje značilno od ostalih tretmajev. Z uporabo dvofotonskega konfokalnega laserskega mikroskopa in barvilom ELF-97[®] smo ugotavljali pojavljanje in aktivnost na površino hif vezane kisle fosfataze pri izbranih eksploracijskih tipih ektomikoriznih gliv. Dokazali smo, da je pojavljanje kisle fosfataze značilno različno ($p < 0,001$) pri posameznih eksploracijskih tipih. Največjo encimsko aktivnost smo opazili pri LD ET, kjer smo encime opazili tako na zunajkoreninskem miceliju kot na mikoriznem plašču, sledili so SD ET, CT ET in MD ET. Pri CT ET so se encimi nahajali le na mikoriznem plašču, medtem ko se encimi pri SD ET in MD ET pogosteje nahajajo na mikoriznem plašču kot na izhajajočih elementih. Vpliv temperature smo raziskovali na LD ET za vsak tretma in nismo opazili značilnih razlik med tretmaji, kar je lahko posledica *in vivo* eksperimenta, kjer substrat, ki obdaja mikorizne korenine zmanjša vpliv temperature. Z izotopskimi analizami $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ v različnih rastlinskih tkivih, mikorizi in substratu smo želeli ugotoviti tok ogljika in dušika med rastlino in glivo in vpliv okoljskih dejavnikov nanj. Dokazali smo vpliv temperature in povišanih koncentracij CO₂ na vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ v listih, stebelu in nemikoriznih koreninah. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ za rastlinska tkiva kot tudi za mikorizo so bile v klimatizirani komori bolj negativne (-36,83‰ do -31,67‰) od rastlinjaka (-31,09‰ do -29,56‰) in tretmaja zunaj (-30,92‰ do -27,74‰), kar je lahko posledica povišanih koncentracij CO₂ v

zraku klimatizirane komore in rastlinjaka v primerjavi s tretmajem zunaj. Listi sadik v klimatizirani komori (-3,05‰ v CR+ in -3,51‰ v CR-) so bili ¹⁵N osiromašeni glede na liste v rastlinjaku (-1,63‰) in zunaj (-0,46‰), medtem ko so bile korenine ¹⁵N obogatene (1,79‰ v CR+ in 1,34‰ v CR-) glede na korenine v rastlinjaku (-0,06‰) in zunaj (0,33‰). Za steblo in mikorizne korenine nismo opazili podobnih vzorcev. Kot mnogi drugi avtorji smo tudi v naši raziskavi potrdili dejstvo, da so mikorizne glive zelo raznolika skupina organizmov in da je za identifikacijo do vrste nujno potrebna kompleksna molekulska analiza. Na biotsko pestrost ektomikoriznih gliv vplivajo tako temperatura kot povišane koncentracije CO₂. Največ ECM tipov smo identificirali v klimatizirani komori (5 v CR+ in 5 v CR-), sledila sta tretmaja v rastlinjaku (3) in zunaj (3). Večji delež ECM korenin pri povišani koncentraciji CO₂ v zraku smo dokazali v tretmajih CR+ (10%), CR- (11%) in GH (11%) v primerjavi z OUT (5%), kjer je bila koncentracija CO₂ v zraku normalna. Poleg tega smo v omenjenih tretmajih največkrat identificirali vrste iz rodu *Scleroderma* (47,6% v CR+, 45,6% v CR-, 84,7% v GH), ki razvijejo obsežen zunajkoreninski preplet hif in rizomorfov v primerjavi s tretmajem zunaj, kjer smo večkrat identificirali vrste iz rodu *Tuber* (45,6% vrst iz rodu *Tuber* in 32,6% vrst iz rodu *Scleroderma*), ki ne razvijejo zunajkoreninskega micelija. Višje temperature in CO₂ pomenijo za rastlino ugodne pogoje, pri katerih so listne reže bolj odprte in fotosinteza nemoteno poteka. Ogljik, ki nastaja v procesu fotosinteze, rastline transportirajo glivam v zameno za anorganska hranila. Dostopnost hranil v tleh je povezana z razvojem različnih (morfo)tipov ektomikoriznih gliv. V primeru, ko je dovolj hranil in kadar so ugodne rastne razmere, da fotosinteza poteka nemoteno, imajo glive dovolj ogljika za razvoj; v tem primeru prevladujejo vrste, ki jih uvrščamo med kontaktne eksploracijske tipe ali eksploracijske tipe na kratke razdalje. Te nimajo ali imajo le deloma razvit zunaj koreninski micelij s pomočjo katerega privzemajo hranilne snovi v tleh. Encimi so večinoma razporejeni na mikoriznem plašču, ki je v tesnem stiku s substratom. Kadar so tla s hranili revna, se razvijejo mikorizne glive z eksploracijskimi tipi na dolge razdalje, ki z razraščanjem zunaj koreninskega micelija dostopajo do otokov hranil v tleh, ki jih transportirajo v rastlino. Omenjeni tipi imajo večji delež encimov na izhajajočih elementih in manj na mikoriznem plašču in v Hartigovi mreži. Rastline nimajo razvite mikorize s samo enim od eksploracijskih tipov, temveč gre za kompleksen sistem eksploracijskih tipov. Encimska aktivnost eksploracijskih tipov ni pogojena le z okoljskimi dejavniki, temveč tudi s funkcijo ektomikorizne glive, ki jo le-ta opravlja v celotnem sistemu. Z izotopskimi analizami ogljika

in dušika smo dokazali pot ogljika od listov do korenin (vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ listov so bolj negativne od vrednosti $\delta^{13}\text{C}$ korenin) in pot dušika od korenin do listov (vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ korenin so bolj pozitivne od vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ listov). Tudi ta proces je zelo kompleksen in odziven na dejavnike iz okolja. Analize $\delta^{13}\text{C}$ omogočajo vpogled v kroženje ogljika v sistemu zrak-rastlina-gliva-tla. Sklepamo lahko na vpliv zunanjih dejavnikov, kot so sprememba temperature, intenziteta svetlobe, vlaga v tleh in substratu, letni čas, in koncentracija CO₂, ki jim je rastlina trenutno izpostavljena. Vsi dejavniki se odražajo v izotopski sestavi ^{13}C listov, ki je ob ugodnih razmerah zaradi visokega deleža fotosinteze osiromašen, saj obogaten ^{13}C rastline iz listov transportirajo do mikoriznih gliv, ki ga vgrajujejo in tako širijo mikorizni preplet v tleh. Tako mikorizne glive ob ugodnih razmerah dobijo več ogljika, se posledično hitreje razraščajo v substratu in iščejo nove vire hranilnih snovi, ki jih v zameno za ogljik izmenjujejo z rastlinami. Z izotopskimi analizami C in N lahko dobimo vpogled v podzemni del sistema, ki je sicer očem neviden. Vrednosti $\delta^{15}\text{N}$ odražajo sestavo substrata v tleh in v talnem profilu, prav tako dajejo pomembno informacijo o ektomikoriznih glivah in obliki dušika, ki ga privzemajo iz tal in osiromašenega transportirajo do listov rastlin, ki so kot končni prejemnik v transportni verigi vedno ^{15}N osiromašeni glede na druga tkiva v transportnem procesu, razen če vmes posežejo drugi dejavniki, kot so temperatura, padavine ali vpliv človeka, ki lahko s svojim delovanjem močno spremeni procese v gozdnih tleh.

6.2 SUMMARY

Temperature changes in forest ecosystems can have a global character, as predicted in prevailing scenarios of climate change, or a local anthropogenic character, when human activities lead to changes in land use and exposure of forest soil, which consequently absorbs more heat. A key factor in net primary production in forest soil are organisms in the mycorrhizosphere, especially roots and mycorrhizal fungi as a crucial component of forest soil ecosystems. In this study, the influence of air and soil temperature on beech seedlings as well as on ectomycorrhizal fungi was investigated. One-year-old beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.) were used in the experiment. They were planted into glass rhizotrons (30 x 50 x 2 cm) and exposed to four different temperature conditions: a cooled chamber with daily temperature between 15-20 °C without cooling of roots (CR-) and with additional cooling of roots by 4-5 °C (CR+), a greenhouse (GH), where summer temperatures reached over 47 °C, and outside (OUT) where seedlings were exposed to natural temperatures in Ljubljana. During the experiment nondestructive analyses of roots were made with monthly imaging, and at the conclusion of the experiment destructive analyses of whole seedlings were performed. Root length and root diameter were greater in all treatments at the end of the experiment. Greenhouse seedlings had the greatest percentage of fine roots, more than 98%, and the smallest average diameter of roots. Mycorrhizal roots were separated from non-mycorrhizal roots and scanned separately with a scanner. The proportion of mycorrhizal roots in the CR+, CR- and GH treatments was between 10.3% and 11.4%, while the proportion of mycorrhizal roots for the outside treatment was half that of the others (5%). The proportion of nonmycorrhizal roots was high in all treatments, with the highest (95%) being in the outside treatment. Mycorrhizal roots were described using an anatomical-morphological method and later identified using molecular and phylogenetic analyses for identification of ectomycorrhizal fungi. We found that the anatomical-morphological method is not the most suitable for identification and that it is necessary to continue with molecular and phylogenetic analyses. Using the anatomical-morphological method, 114 types of ECM fungi were described, of which only two were specified as to genus (*Scleroderma* sp. in 34 cases and *Tuber* sp. in four cases) and one as to species (*Cenococcum geophilum* Fr.). For the remaining 83 types of ECM we were unable to identify the genus. Using molecular analyses, 114 types of ECM were successfully identified as to genus (*Scleroderma* sp. in 34 cases,

Tuber sp. in 56 cases, *Trichophaea* sp. in 13 cases, *Pulvinula* sp. in 9 cases, *Peziza* sp. in one case, and *Hebeloma* sp. in one case). Despite the continuation of identification of *Scleroderma* sp. and *Tuber* sp. with phylogenetic analyses, we were unable to identify them as to species. Species from the genera *Trichophaea* and *Pulvinula* were also not identified as to species, since there were too few sequences in the online databases. We successfully identified the species *Hebeloma mesophaeum* (P.) Q. and *Peziza ostracoderma* K. Different growth parameters (SRL, SLA, LAR) were calculated from the measurements obtained. Soil temperature was found to have an influence on specific root length (SRL), which was significantly greater ($p < 0.05$) in seedlings with no additional cooling of roots (CR-) compared to seedlings with additional cooling of roots (CR+). Significant differences ($p < 0.001$) in reduced specific leaf area (SLA) on seedlings in the cooled chamber and in the greenhouse could be a consequence of a higher concentration of CO₂ in air. Significant differences ($p < 0.001$) in the reduction of leaf area ratio (LAR) between CR+ and GH, and between CR+ and OUT, were observed, while CR- was not significantly different from other treatments. A two-photon confocal laser scanning microscope and ELF-97[®] commercial kit were used for establishing the activity and occurrence of surface-bound phosphatase activity in different exploration types of ectomycorrhizal fungi. Occurrence of acid phosphatase was significantly different ($p < 0.001$) in individual exploration types. The highest enzymatic activity was observed in LD ET, where they were observed on the ectomycorrhizal mantle as well as on the extramatrical mycelium. LD ET was followed by SD ET, CT ET and MD ET. In CT ET enzymes were located only on the ectomycorrhizal mantle, while in SD ET and MD ET enzymes were more often found on the ectomycorrhizal mantle but they were also observed on emanating elements. The effect of temperature was investigated in LD ET and no significant differences were found among treatments, which may be due to the *in vivo* nature of the experiment, where surrounding substrate could reduce the impact of temperature. Isotopic analyses of $\delta^{15}\text{N}$ in $\delta^{13}\text{C}$ in different parts of plant tissue, mycorrhizal fungi and soil were used to establish nitrogen and carbon flow between fungi and the host plant, and also the influence of environmental conditions on it. Temperature and higher concentrations of CO₂ affect $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values in leaves, stems and nonmycorrhizal roots. Plant tissues and mycorrhiza were more depleted of $\delta^{13}\text{C}$ in the cooled chamber (-36.83‰ to -31.67‰) than in the greenhouse (-31.09‰ to -29.56‰) and in the outside treatment (-30.92‰ to -27.74‰), which may be a consequence of higher CO₂ concentrations. Leaves in the cooled chamber

(-3.05‰ in CR+ and -3.51‰ in CR-) were ¹⁵N depleted compared to leaves in the greenhouse (-1.63‰) and outside (-0.46‰), while roots were ¹⁵N enriched (1.79‰ in CR+ and 1.34‰ in CR-) compared to roots in the greenhouse (-0.06‰) and outside treatments (0.33‰). No similar patterns were observed for stems and mycorrhizal roots. Like many other scientists, we also confirmed in this study that mycorrhizal fungi are a very diverse group of organisms, and that complex molecular analysis is required for identification at species level. Biotic diversity of ectomycorrhizal fungi was influenced by temperature and elevated CO₂ concentrations. Most of the ECM types were identified in the cooled chamber (5 in CR+ and 5 in CR-), followed by treatments in the greenhouse (3) and outside (3). Higher proportions of ECM roots under elevated CO₂ concentration in the air were observed in CR+ (10%), CR- (11%) and GH (11%) than in OUT (5%), where the CO₂ concentration was normal. Furthermore, in the treatments mentioned *Scleroderma* species were most often identified (47.6% in CR+, 45.6% in CR-, 84.7% in GH), which developed a large extramatrical mycelium compared to the outside treatment, where mostly *Tuber* species were identified (45.6% species from the genus *Tuber* and 32.6% species from the genus *Scleroderma*), with no extramatrical mycelia. Higher temperatures and CO₂ create more favorable conditions, in which the stomata are more open and photosynthesis is undisturbed. Carbon as a product of the photosynthetic process is transported from the host to the fungi in exchange for inorganic nutrients. Accessibility of the nutrients in forest soils is associated with the development of different morphotypes of ectomycorrhizal fungi. When enough nutrients are available and growth conditions are favorable, fungi have enough carbon for their development and consequently the contact and short-distance exploration types are dominant in forest soils. The exploration types mentioned developed no or few emanating elements, and enzymes were located mostly on the mycorrhizal mantle, which is in close contact with soils. When forest soils are nutrient-poor, long-distance exploration types develop, with their highly differentiated extramatrical mycelia growing into the soil searching for nutrient pools, and transporting nutrients to the host plant. Long-distance exploration types have more enzymes on extramatrical mycelia than on the mycorrhizal mantle and the Hartig net. Plants developed a complex net of mycorrhizal connection with different types of exploration types. Enzymatic activity of exploration types depended on environmental factors and also on the function that ectomycorrhizal fungi had in the whole system. Isotopic analyses of δ¹⁵N and δ¹³C showed the flow of carbon from leaves to the roots (leaves were ¹³C depleted compared to roots) and

the flow of nitrogen from roots to the leaves (roots were ¹⁵N enriched compared to leaves). This process is also very complex and dependent on environmental factors. The δ¹³C analyses provide us with an insight into carbon circulation in the air-plant-fungi-soil system. From δ¹³C data, we can deduce the impact of changes in temperature, light intensity, soil moisture and also on the time of the year to which the plants were exposed. All factors are reflected in the isotopic structure of ¹³C of leaves, which is depleted in favorable conditions because of high photosynthesis, since enriched ¹³C is transported from leaves to roots and mycorrhizal fungi. Mycorrhizal fungi consequently grow faster into substrate searching for nutrients that are transported to the host plant in exchange for carbon. δ¹⁵N analyses enable an insight into the belowground system. The δ¹⁵N values reflect the soil structure and the soil profile and also provide information on ectomycorrhizal fungi and the form of nitrogen uptake from soil. Mycorrhizal fungi transported depleted ¹⁵N to the leaves, which as the final recipient in the transport chain are ¹⁵N depleted unless other factors such as temperature, precipitation or human activity are present.

7 LITERATURA

- Agencija republike Slovenije za okolje. Napoved za letalstvo. 2014. (18. jun. 2014)
http://www.arso.gov.si/vreme/napovedi%20in%20podatki/letalstvo_nap.html (18. jun. 2014)
- Agerer R. 1987-2008. Colour atlas of ectomycorrhizae with glossary. Einhorn-Verlag. Schwabisch-Gmund.
- Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. Mycorrhiza, 11, 2: 107-114
- Agerer R., Christan, J., Mayr, C., Hobbie, E. 2012. Isotopic signatures and trophic status of Ramaria. Mycological Progress, 11, 1: 47-59
- Al Sayegh-Petkovšek S. A., Pokorny, B. A. 2006. Glive kot odzivni in akumulacijski bioindikatorji onesnaženosti gozdnih rastišč v Šaleški dolini. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 81: 61-71
- Al Sayegh Petkovšek S., Pokorny, B., Ribarič-Lasnik, C., Vrtačnik, J. 2002. Vsebnosti Cd, Pb, Hg in As v trosnjakih gliv iz gozdnate krajine Šaleške doline. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 67: 5-46
- Alberton O., Kuyper, T. W., Gorissen, A. 2005. Taking mycocentrism seriously: mycorrhizal fungal and plant responses to elevated CO₂. New Phytologist, 167, 3: 859-68
- Altschul S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 215, 3: 403-410
- Alvarez M., Gieseke, A., Godoy, R., Härtel, S. 2006. Surface-bound phosphatase activity in ectomycorrhizal fungi: a comparative study between a colorimetric and a microscope-based method. Biology and Fertility of Soils, 42, 6: 561-568
- Alvarez M., Godoy, R., Heyser, W., Härtel, S. 2004. Surface-bound phosphatase activity in living hyphae of ectomycorrhizal fungi of *Nothofagus obliqua*. Mycologia, 96, 3: 479-487
- Alvarez M., Godoy, R., Heyser, W., Härtel, S. 2005. Anatomical-physiological determination of surface bound phosphatase activity in ectomycorrhizae of *Nothofagus obliqua*. Soil Biology and Biochemistry, 37, 1: 125-132
- Alvarez M., Huygens, D., Díaz, L. M., Villanueva, C. A., Heyser, W., Boeckx, P. 2012. The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissues depends on

- soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake. *Plant, Cell & Environment*, 35, 1: 126-135
- Amicucci A., Zambonelli, A., Guidi, C., Stocchi, V. 2001. Morphological and molecular characterisation Of *Pulvinula constellatio* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Letters*, 194, 2: 121-125
- Amundson R., Austin, A. T., Schuur, E. a. G., Yoo, K., Matzek, V., Kendall, C., Uebersax, A., Brenner, D., Baisden, W. T. 2003. Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. *Global Biogeochemical Cycles*, 17, 1: 1031
- Atlas R., Bartha, R. 1981. *Microbial ecology: fundamentals and application*. Reading, Addison-Wesley Publishing Company: 560 str.
- Avise J. C. 2006. *Evolutionary pathways in Nature. A Phylogenetic Approach*. Cambridge, New York., Cambridge University Press: 286 str.
- Baghel R. K., Sharma, R., Pandey, A. K. 2009. Activity of acid phosphatase in the ectomycorrhizal fungus *Cantharellus tropicalis* under controlled conditions. *Journal of Tropical Forest Science*, 21, 3: 218-222
- Barbati A., P, P. C., Marchetti, M. 2011. Annex 1: Pilot Application of the European Forest Types. V: *Fores Europe, UNECE and FAO 2011: State of Europe's Forests 2011. Status and Trends in Sustainable Forest Management in Europe*. Oslo, Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe: 259–273
- Baum D. 2008. Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups. *Nature Education*, 1, 1: 190
- Bradshaw R. H. W., Kito, N., Giesecke, T. 2010. Factors influencing the Holocene history of *Fagus*. *Forest Ecology and Management*, 259, 11: 2204-2212
- Brimecombe M. J., De Leij F. A. A. M., Lynch J. M. 2007. Rhizodeposition and microbial populations. V: *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. 2nd edition. Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P. (ur.). 2007. New York, Taylor and Francis group: 90 str.
- Bronson D. R., Gower, S. T., Tanner, M., Linder, S., Van Herk, I. 2008. Response of soil surface CO₂ flux in a boreal forest to ecosystem warming. *Global Change Biology*, 14, 4: 856-867

- Bruhn D. a. N., Leverenz, J. W., Saxe, H. 2000. Effects of tree size and temperature on relative growth rate and its components of *Fagus sylvatica* seedlings exposed to two partial pressures of atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 146, 3: 415-425
- Brundrett M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79, 3: 473-495
- Brundrett M.C. 2008. *Mycorrhizal Associations: The Web Resource*. Version 2.0. (18. jun. 2014)
<http://mycorrhizas.info/> (18. jun. 2014)
- Bruns T. D., Bidartondo, M. I., Taylor, D. L. 2002. Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do the Exceptions Tell Us? *Integrative and Comparative Biology*, 42, 2: 352-359
- Buée M., Courty, P. E., Mignot, D., Garbaye, J. 2007. Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 8: 1947-1955
- Buee M., Vairelles, D., Garbaye, J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus silvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza*, 15, 4: 235-45
- Cairney J. G. 2011. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant and Soil*, 344, 1-2: 51-71
- Cavalli-Sforza L. L., Edwards, A. W. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19, 1: 233-57
- Cheng S.-L., Fang, H.-J., Yu, G.-R., Zhu, T.-H., Zheng, J.-J. 2010. Foliar and soil 15N natural abundances provide field evidence on nitrogen dynamics in temperate and boreal forest ecosystems. *Plant and Soil*, 337, 1-2: 285-297
- Conchello J.-A., Lichtman, J. W. 2005 Optical sectioning microscopy. *Nature Methods*, 2, 12: 920-931
- Cook R. 1977. Detection of Influential observation in linear regression. *Technometrics*, 19, 1: 1-18
- Courty P.-E., Buée, M., Diedhiou, A. G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F., Rineau, F., Turpault, M.-P., Uroz, S., Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 5: 679-698

- Craine J. M., Elmore, A. J., Aidar, M. P. M., Bustamante, M., Dawson, T. E., Hobbie, E. A., Kahmen, A., Mack, M. C., Mclauchlan, K. K., Michelsen, A., Nardoto, G. B., Pardo, L. H., Peñuelas, J., Reich, P. B., Schuur, E. a. G., Stock, W. D., Templer, P. H., Virginia, R. A., Welker, J. M., Wright, I. J. 2009. Global patterns of foliar nitrogen isotopes and their relationships with climate, mycorrhizal fungi, foliar nutrient concentrations, and nitrogen availability. *New Phytologist*, 183, 4: 980-992
- Cripps C. L. 2004. Ectomycorrhizal fungi above and below ground in a small, isolated aspen stand: a simple system reveals fungal fruiting strategies and an edge effect. V: *Fungi in forest ecosystems: systematics, diversity, and ecology*. Cripps C. L. (ur.). 2004. (Memoirs of the New York Botanical Garden, 89). Bozeman, Montana State University: 249-265
- Criquet S., Ferre, E., Farnet, A. M., Le Petit, J. 2004. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 7: 1111-1118
- Cullings K. W., Vogler, D. R., Parker, V. T., Finley, S. K. 2000. Ectomycorrhizal specificity patterns in a mixed *Pinus contorta* and *Picea engelmannii* forest in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 11: 4988- 4991
- Darrington J. in sod. 2011. GNU PSPP. version 0.7.8. Boston: Free Software Foundation. (7. nov. 2011)
<http://www.gnu.org/software/pspp/> (13. mar. 2015)
- Dang Q.-L., Cheng, S. 2004. Effects of soil temperature on ecophysiological traits in seedlings of four boreal tree species. *Forest Ecology and Management*, 194, 1–3: 379-387
- Dawson T. E., Mambelli, S., Plamboeck, A. H., Templer, P. H., Tu, K. P. 2002. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 1: 507-559
- Deckmyn G., Meyer, A., Smits, M. M., Ekblad, A., Grebenc, T., Komarov, A., Kraigher, H. 2014. Simulating ectomycorrhizal fungi and their role in carbon and nitrogen cycling in forest ecosystems. *Canadian Journal of Forest Research*, 44, 6: 535-553
- Denk W., Delaney, K. R., Gelperin, A., Kleinfeld, D., Strowbridge, B. W., Tank, D. W., Yuste, R. 1994. Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 54, 2: 151-162

- Denk W., Strickler, J. H., Webb, W. W. 1990. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248, 4951: 73-76
- Di Pietro M., Churin, J.-L., Garbaye, J. 2007. Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. *Mycorrhiza*, 17, 6: 547-550
- Eissenstat D. M. 1992. Costs and benefits of constructing roots of small diameter. *Journal of Plant Nutrition*, 15, 6-7: 763-782
- Ekblad A., Wallander, H., Godbold, D. L., Cruz, C., Johnson, D., Baldrian, P., Björk, R. G., Epron, D., Kieliszewska-Rokicka, B., Kjøller, R., Kraigher, H., Matzner, E., Neumann, J., Plassard, C. 2013. The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling. *Plant and Soil*, 366, 1-2: 1-27
- Ekblad A. L. F., Wallander, H., Näsholm, T. 1998. Chitin and ergosterol combined to measure total and living fungal biomass in ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 138, 1: 143-149
- Epron D., Liozon, R., Mousseau, M. 1996. Effects of elevated CO₂ concentration on leaf characteristics and photosynthetic capacity of beech (*Fagus sylvatica*) during the growing season. *Tree Physiology*, 16, 4: 425-432
- European forest types. Categories and types for sustainable forest management reporting and policy. EEA Technical report. 2006. Copenhagen, European Environment Agency, 9: 1-114
- Fang J., Lechowicz, M. J. 2006. Climatic limits for the present distribution of beech (*Fagus* L.) species in the world. *Journal of Biogeography*, 33, 10: 1804-1819
- Farquhar G. D., Ehleringer, J. R., Hubick, K. T. 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 1: 503-537
- Finér L., Helmisaari, H. S., Lõhmus, K., Majdi, H., Brunner, I., Børja, I., Eldhuset, T., Godbold, D., Grebenc, T., Konôpka, B., Kraigher, H., Möttönen, M. R., Ohashi, M., Oleksyn, J., Ostonen, I., Uri, V., Vanguelova, E. 2007. Variation in fine root biomass of three European tree species: Beech (*Fagus sylvatica* L.), Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.), and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 141, 3: 394-405

- Finlay R. D., Read D. J. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytologist*, 103, 1: 157-165
- Finlay R., Wallander, H., Smits, M., Holmstrom, S., Van Hees, P., Lian, B., Rosling, A. 2009. The role of fungi in biogenic weathering in boreal forest soils. *Fungal Biology Reviews*, 23, 4: 101-106
- Finzi A. C., Norby, R. J., Calfapietra, C., Gallet-Budynek, A., Gielen, B., Holmes, W. E., Hoosbeek, M. R., Iversen, C. M., Jackson, R. B., Kubiske, M. E., Ledford, J., Liberloo, M., Oren, R., Polle, A., Pritchard, S., Zak, D. R., Schlesinger, W. H., Ceulemans, R. 2007. Increases in nitrogen uptake rather than nitrogen-use efficiency support higher rates of temperate forest productivity under elevated CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 35: 14014-14019
- Földes-Papp Z., Demel, U., Tilz, G. P. 2003. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *International Immunopharmacology*, 3, 13–14: 1715-1729
- Frey-Klett P., Garbaye, J., Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176, 1: 22-36
- Gardes M., Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 2: 113-8
- Genbank. 2014. NCBI (28. okt. 2009)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (24. mar. 2014)
- Geßler A., Keitel, C., Kreuzwieser, J., Matyssek, R., Seiler, W., Rennenberg, H. 2007. Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees*, 21, 1: 1-11
- Global forest resources assessment 2010 : main report. 2010. (FAO forestry paper ; 163). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 479 str. (18. jun. 2014)
http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CC8QFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2Fdocrep%2F013%2Fi1757e%2Fi1757e.pdf&ei=8JmhU87rEI9ywOm_4K4BQ&usg=AFQjCNHU_SjAdFYs-JJ_r6VRHCbfYkT2oA&bvm=bv.69137298,d.bGE (18. jun. 2014)

- Godbold D. L., Brunner, I. 2007. The platform for European root science, COST action E38: An introduction and overview. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 141, 3: 390-393
- Grams T. E. E., Kozovits, A. R., Reiter, I. M., Barbro Winkler, J., Sommerkorn, M., Blaschke, H., Häberle, K. H., Matyssek, R. 2002. Quantifying Competitiveness in Woody Plants. *Plant Biology*, 4, 2: 153-158
- Grebenc T., Christensen, M., Vilhar, U., Čater, M., Martín, M. P., Simončič, P., Kraigher, H. 2009. Response of ectomycorrhizal community structure to gap opening in natural and managed temperate beech-dominated forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 39, 7: 1375-1386
- Handley L. L., Daft, M. J., Wilson, J., Scrimgeour, C. M., Ingleby, K., Sattar, M. A. 1993. Effects of the ecto- and VA-mycorrhizal fungi *Hydnagium carneum* and *Glomus clarum* on the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of *Eucalyptus globulus* and *Ricinus communis*. *Plant, Cell & Environment*, 16, 4: 375-382
- Harley J. L. 1989. The significance of mycorrhiza. *Mycological Research*, 92, 2: 129-139
- Hawkes C. V., Hartley, I. P., Ineson, P., Fitter, A. H. 2008. Soil temperature affects carbon allocation within arbuscular mycorrhizal networks and carbon transport from plant to fungus. *Global Change Biology*, 14, 5: 1181-1190
- He X.H., Critchley, C., Bledsoe, C. 2003. Nitrogen Transfer Within and Between Plants Through Common Mycorrhizal Networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 6: 531-567
- Hedh J., Wallander, H., Erland, S. 2008. Ectomycorrhizal mycelial species composition in apatite amended and non-amended mesh bags buried in a phosphorus-poor spruce forest. *Mycological Research*, 112, 6: 681-688
- Heinemeyer A., Hartley, I. P., Evans, S. P., Carreira De La Fuente, J. A., Ineson, P. 2007. Forest soil CO₂ flux: uncovering the contribution and environmental responses of ectomycorrhizas. *Global Change Biology*, 13, 8: 1786-1797
- Heintzmann R., Ficzy, G. 2006. Breaking the resolution limit in light microscopy. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 5, 4: 289-301
- Hell S. W., Wichmann, J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19, 11: 780-2

- Helmchen F., Denk, W. 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2, 12: 932-940
- Hendricks J. J., Mitchell, R. J., Kuehn, K. A., Pecot, S. D., Sims, S. E. 2006. Measuring external mycelia production of ectomycorrhizal fungi in the field: the soil matrix matters. *New Phytologist*, 171, 1: 179-186
- Herzog C., Peter, M., Pritsch, K., Gunthardt-Goerg, M. S., Egli, S. 2013. Drought and air warming affects abundance and exoenzyme profiles of *Cenococcum geophilum* associated with *Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*. *Plant Biology*: 1, 230-237
- Hibbett D. S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., Nilsson, R. H. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25, 1: 38-47
- Hillis D. M., Bull, J. J. 1993. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, 42, 2: 182-192
- Hobbie E., Agerer, R. 2010. Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types. *Plant and Soil*, 327, 1-2: 71-83
- Hobbie E. A. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology*, 87, 3: 563-569
- Hobbie E. A., Colpaert, J. V. 2003. Nitrogen availability and colonization by mycorrhizal fungi correlate with nitrogen isotope patterns in plants. *New Phytologist*, 157, 1: 115-126
- Hobbie E. A., Colpaert, J. V. 2004. Nitrogen availability and mycorrhizal colonization influence water use efficiency and carbon isotope patterns in *Pinus sylvestris*. *New Phytologist*, 164, 3: 515-525
- Hobbie E. A., Högberg, P. 2012. Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. *New Phytologist*, 196, 2: 367-382
- Hobbie E. A., Jumpponen, A., Trappe, J. 2005. Foliar and fungal ¹⁵N:¹⁴N ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. *Oecologia*, 146, 2: 258-68
- Hoch G. 2011. Reciprocal root-shoot cooling and soil fertilization effects on the seasonal growth of two treeline conifer species. *Plant Ecology & Diversity*, 6, 1: 21-30
- Hodge A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162, 1: 9-24

- Hodge A., Fitter, A. H. 2010. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 31: 13754-13759
- Hoering T. 1955. Variations of Nitrogen-15 Abundance in Naturally Occurring Substances. *Science*, 122, 3182: 1233-4
- Horton T. R., Bruns, T. D. 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytologist*, 139, 2: 331-339
- Huntley B., Bartlein, P. J., Prentice, I. C. 1989. Climatic control of the distribution and abundance of beech in Europe and North America. *Journal of Biogeography*, 16: 551-560
- Janssens I. A., Lankreijer, H., Matteucci, G., Kowalski, A. S., Buchmann, N., Epron, D., Pilegaard, K., Kutsch, W., Longdoz, B., Grünwald, T., Montagnani, L., Dore, S., Rebmann, C., Moors, E. J., Grelle, A., Rannik, Ü., Morgenstern, K., Oltchev, S., Clement, R., Guðmundsson, J., Minerbi, S., Berbigier, P., Ibrom, A., Moncrieff, J., Aubinet, M., Bernhofer, C., Jensen, N. O., Vesala, T., Granier, A., Schulze, E. D., Lindroth, A., Dolman, A. J., Jarvis, P. G., Ceulemans, R., Valentini, R. 2001. Productivity overshadows temperature in determining soil and ecosystem respiration across European forests. *Global Change Biology*, 7, 3: 269-278
- Johnson J., Spence, M. T. Z. 2010. Phosphatase-Based Signal Amplification Techniques. V: *The Molecular Probes® Handbook. A guide to fluorescence probes and labeling technologies*. 11th edition. Life Technologies Corporation: 203-211 (18. jun. 2014)
<http://www.lifetechnologies.com/si/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/ultrasensitive-detection-technology/enzyme-labeled-fluorescence-signal-amplification-technology.html#head2> (8. jan. 2015)
- Katoh K., Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 4: 772-780
- Kennedy P. G., Izzo, A. D., Bruns, T. D. 2003. There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understorey and canopy trees in a mixed evergreen forest. *Journal of Ecology*, 91, 6: 1071-1080

- King J., Pregitzer, K., Zak, D. 1999. Clonal variation in above- and below-ground growth responses of *Populus tremuloides* Michaux: Influence of soil warming and nutrient availability. *Plant and Soil*, 217, 1-2: 119-130
- Kjølner A. H., Struwe, S. 2002. Fungal communities, succession, enzymes and decomposition. V: *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Bruns R. G. and Dick R. P. (ur.). 2002. New York, CRC Press: 267-285
- Kohen A. E., Venet, L., Mousseau, M. 1993. Growth and Photosynthesis of Two Deciduous Forest Species at Elevated Carbon Dioxide. *Functional Ecology*, 7, 4: 480–486
- Kõljalg U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B. D., Lücking, R., Martín, M. P., Matheny, P. B., Nguyen, N. H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K. G., Peintner, U., Peterson, M., Põldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J. A., Senés, C., Smith, M. E., Suija, A., Taylor, D. L., Telleria, M. T., Weiss, M., Larsson, K.-H. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 22, 21: 5271-5277
- Kowalchuk G., Smit, E. 2004. Section 3 update: Fungal Community Analysis using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). V: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D. in van Elsas J.D. (ur.). 2004. Netherlands, Springer: 2673-2690
- Kraigher H. 1996. Tipi ektomikorize – Taksonomija, pomen in aplikacije. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 49: 33-66
- Kraigher H. 1999. Diversity of types of ectomycorrhizae on Norway spruce in Slovenia. *Phyton (Horn)*, 39, 3: 199-202
- Kraigher H., Agerer, R., Javornik, B. 1995. Ectomycorrhizae of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterized by anatomical and molecular tools. *Mycorrhiza*, 5, 3: 175-180
- Kramer K., Degen, B., Buschbom, J., Hickler, T., Thuiller, W., Sykes, M. T., De Winter, W. 2010. Modelling exploration of the future of European beech (*Fagus sylvatica* L.) under climate change—Range, abundance, genetic diversity and adaptive response. *Forest Ecology and Management*, 259, 11: 2213-2222

- Kranabetter J. M. 2005. Understory conifer seedling response to a gradient of root and ectomycorrhizal fungal contact. *Canadian Journal of Botany*, 83, 6: 638-646
- Lahti M., Aphalo, P. J., Finér, L., Ryyppö, A., Lehto, T., Mannerkoski, H. 2005. Effects of soil temperature on shoot and root growth and nutrient uptake of 5-year-old Norway spruce seedlings. *Tree Physiology*, 25, 1: 115-122
- Landeweert R., Hoffland, E., Finlay, R. D., Kuyper, T. W., Van Breemen, N. 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 5: 248-254
- Le Tacon F., Zeller B., Plain C., Hossann C., Bréchet C., Robin C. 2013. Carbon Transfer from the Host to *Tuber melanosporum* Mycorrhizas and Ascocarps Followed Using a ¹³C Pulse-Labeling Technique. *PLoS ONE*, 8, 5: e64626
- Lehto T., Zwiazek, J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza*, 21, 2: 71-90
- Lewis D. H. 1985. Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics. V: *The Biology of Mutualism*. Boucher DH. (ur.). 1985. London, Croom Helm: 29-39
- Lilleskov E. A., Hobbie, E. A., Fahey, T. J. 2002. Ectomycorrhizal fungal taxa differing in response to nitrogen deposition also differ in pure culture organic nitrogen use and natural abundance of nitrogen isotopes. *New Phytologist*, 154, 1: 219-231
- Lindahl B. D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S. E., Högberg, P., Stenlid, J., Finlay, R. D. 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist*, 173, 3: 611-620
- Lindahl B. D., Taylor, A. F. S. 2004. Occurrence of N-acetylhexosaminidase-encoding genes in ectomycorrhizal basidiomycetes. *New Phytologist*, 164, 1: 193-199
- Lippincott-Schwartz J., Patterson, G. H. 2003. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300, 5616: 87-91
- Litton C. M., Raich, J. W., Ryan, M. G. 2007. Carbon allocation in forest ecosystems. *Global Change Biology*, 13, 10: 2089-2109
- 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
- Lyr H., Garbe, V. 1995. Influence of root temperature on growth of *Pinus sylvestris*, *Fagus sylvatica*, *Tilia cordata* and *Quercus robur*. *Trees*, 9, 4: 220-223

- Mainiero R., Kazda, M., Schmid, I. 2010. Fine root dynamics in 60-year-old stands of *Fagus sylvatica* and *Picea abies* growing on haplic luvisol soil. *European Journal of Forest Research*, 129, 6: 1001-1009
- Majdi H., Truus, L., Johansson, U., Nylund, J.-E., Wallander, H. 2008. Effects of slash retention and wood ash addition on fine root biomass and production and fungal mycelium in a Norway spruce stand in SW Sweden. *Forest Ecology and Management*, 255, 7: 2109-2117
- Malcolm G. M., López-Gutiérrez, J. C., Koide, R. T., Eissenstat, D. M. 2008. Acclimation to temperature and temperature sensitivity of metabolism by ectomycorrhizal fungi. *Global Change Biology*, 14, 5: 1169-1180
- Manual editing of a band matching. 2009. V: *Applied maths: The BioNumerics manual version 6.0.*: 384
- McCormack M. L., Adams T. S., Smithwick E. A. H., Eissenstat D. M. 2012. Predicting fine root lifespan from plant functional traits in temperate trees. *New Phytologist*, 195,4: 823-832
- Meehl G., Stocker, T., Collins, W., Friedlingstein, P., Gaye, A., Gregory, J., Kitoh, A., Knutti, R., Murphy, J., Noda, A., Raper, S., Watterson, I., Weaver, A., Zhao, Z.-C. 2007. *Global Climate Projections. V: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Solomon S, Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L. (ur.). United Kingdom & New York, Cambridge University Press: 1-100
- Meier I. C., Leuschner, C. 2008. Belowground drought response of European beech: fine root biomass and carbon partitioning in 14 mature stands across a precipitation gradient. *Global Change Biology*, 14, 9: 2081-2095
- Meier I. C., Leuschner, C. 2010. Variation of soil and biomass carbon pools in beech forests across a precipitation gradient. *Global Change Biology*, 16, 3: 1035-1045
- Melillo J. M., Butler, S., Johnson, J., Mohan, J., Steudler, P., Lux, H., Burrows, E., Bowles, F., Smith, R., Scott, L., Vario, C., Hill, T., Burton, A., Zhou, Y.-M., Tang, J. 2011. Soil warming, carbon–nitrogen interactions, and forest carbon budgets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 23: 9508-9512

- Michelot A., Bréda, N., Damesin, C., Dufrêne, E. 2012. Differing growth responses to climatic variations and soil water deficits of *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea* and *Pinus sylvestris* in a temperate forest. *Forest Ecology and Management*, 265: 161-171
- Michelsen A., Quarmby, C., Sleep, D., Jonasson, S. 1998. Vascular plant ¹⁵N natural abundance in heath and forest tundra ecosystems is closely correlated with presence and type of mycorrhizal fungi in roots. *Oecologia*, 115, 3: 406-418
- Morison J. I. L., Lawlor, D. W. 1999. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell & Environment*, 22, 6: 659-682
- Muyzer G., De Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Nakatsu C. H., Torsvik, V., Øvreås, L. 2000. Soil Community Analysis Using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 4: 1382-1388
- National Center for Biotechnology information. (18. jun. 2014)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (5. jan. 2015)
- Navarro F. A., So, P. T., Nirmalan, R., Kropf, N., Sakaguchi, F., Park, C. S., Lee, H. B., Orgill, D. P. 2004. Two-photon confocal microscopy: a nondestructive method for studying wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 114, 1: 121-8
- Nygren C. M., Edqvist, J., Elfstrand, M., Heller, G., Taylor, A. F. 2007. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 17, 3: 241-8
- Odum E. P. 1971. *Fundamentals of Ecology*. 3rd edition. Michigan, W.B. Saunders Company: 574 str.
- Ostonen I., Helmisaari, H.-S., Borken, W., Tedersoo, L., Kukumägi, M., Bahram, M., Lindroos, A.-J., Nöjd, P., Uri, V., Merilä, P., Asi, E., Lõhmus, K. 2011. Fine root foraging strategies in Norway spruce forests across a European climate gradient. *Global Change Biology*, 17, 12: 3620-3632
- Ostonen I., Lõhmus, K., Pajuste, K. 2005. Fine root biomass, production and its proportion of NPP in a fertile middle-aged Norway spruce forest: Comparison of soil core and ingrowth core methods. *Forest Ecology and Management*, 212, 1–3: 264-277

- Ostonen I., Püttsepp, Ü., Biel, C., Alberton, O., Bakker, M. R., Lõhmus, K., Majdi, H., Metcalfe, D., Olsthoorn, A. F. M., Pronk, A., Vanguelova, E., Weih, M., Brunner, I. 2007. Specific root length as an indicator of environmental change. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 141, 3: 426-442
- Overdieck D., Ziche, D., Bottcher-Jungclaus, K. 2007. Temperature responses of growth and wood anatomy in European beech saplings grown in different carbon dioxide concentrations. *Tree Physiology*, 27, 2: 261-268
- Parádi I., Baar, J. 2006. Mycorrhizal fungal diversity in willow forests of different age along the river Waal, The Netherlands. *Forest Ecology and Management*, 237, 1–3: 366-372
- Peay K. G., Kennedy, P. G., Bruns, T. D. 2011. Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? *Fungal Ecology*, 4, 3: 233-240
- Peng Y. Y., Dang, Q.-L. 2003. Effects of soil temperature on biomass production and allocation in seedlings of four boreal tree species. *Forest Ecology and Management*, 180, 1–3: 1-9
- Peterson R. L., Massicote, H. B., Melville, L. H. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Oxon, CABI Publishing: 5-43
- Plain C., Gerant, D., Maillard, P., Dannoura, M., Dong, Y., Zeller, B., Priault, P., Parent, F., Epron, D. 2009. Tracing of recently assimilated carbon in respiration at high temporal resolution in the field with a tuneable diode laser absorption spectrometer after in situ ¹³CO₂ pulse labelling of 20-year-old beech trees. *Tree Physiology*, 29, 11: 1433-45
- Plassard C., Dell, B. 2010. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology*, 30, 9: 1129-1139
- Poethig R. S. 1997. Leaf Morphogenesis in Flowering Plants. *Plant Cell*, 9, 1077–1087
- Pregitzer K. S., Deforest, J. L., Burton, A. J., Allen, M. F., Ruess, R. W., Hendrick, R. L. 2002. Fine root architecture of nine north american trees. *Ecological Monographs*, 72, 2: 293-309
- Pregitzer K. S., King, J. S., Burton, A. J., Brown, S. E. 2000. Responses of tree fine roots to temperature. *New Phytologist*, 147, 1: 105-115
- Primer sequences. 2002. Bruns lab. (22. okt. 2002)
<http://nature.berkeley.edu/brunslab/tour/primers.html> (14. feb. 2014)

- Pritchard S. G., Rogers, H. H., Prior, S. A., Peterson, C. M. 1999. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology*, 5, 7: 807-837
- Pritchard S. G., Strand, A. E., McCormack, M. L., Davis, M. A., Finzi, A. C., Jackson, R. B., Matamala, R., Rogers, H. H., Oren, R. a. M. 2008a. Fine root dynamics in a loblolly pine forest are influenced by free-air-CO₂-enrichment: a six-year-minirhizotron study. *Global Change Biology*, 14, 3: 588-602
- Pritchard S. G., Strand, A. E., McCormack, M. L., Davis, M. A., Oren, R. 2008b. Mycorrhizal and rhizomorph dynamics in a loblolly pine forest during 5 years of free-air-CO₂-enrichment. *Global Change Biology*, 14, 6: 1252-1264
- Pritsch K., Courty, P., Churin, J.-L., Cloutier-Hurteau, B., Ali, M., Damon, C., Duchemin, M., Egli, S., Ernst, J., Fraissinet-Tachet, L., Kuhar, F., Legname, E., Marmesse, R., Müller, A., Nikolova, P., Peter, M., Plassard, C., Richard, F., Schlöter, M., Selosse, M.-A., Franc, A., Garbaye, J. 2011. Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*, 21, 7: 589-600
- Pritsch K., Raidl, S., Marksteiner, E., Blaschke, H., Agerer, R., Schlöter, M., Hartmann, A. 2004. A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 2: 233-41
- 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, 2–3: 413-424
- Robinson D. 2001. delta(15)N as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 3: 153-162
- Rose L., Leuschner, C., Köckemann, B., Buschmann, H. 2009. Are marginal beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances a source for drought tolerant ecotypes? *European Journal of Forest Research*, 128, 4: 335-343
- Rottenfusser R., Martini, S., Davidson, M. W. 2014. Numerical Aperture and Image resolution.
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/basics/numericalapertureimageresolution/indexflash.html> (22. jun. 2014)

- Rygiewicz P., Johnson, M., Ganio, L., Tingey, D., Storm, M. 1997. Lifetime and temporal occurrence of ectomycorrhizae on ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Laws.) seedlings grown under varied atmospheric CO₂ and nitrogen levels. *Plant and Soil*, 189, 2: 275-287
- Ryser P. 2006. The mysterious root length. *Plant and Soil*, 286, 1-2: 1-6
- Saxe H., Cannell, M. G. R., Johnsen, Ø., Ryan, M. G., Vourlitis, G. 2001. Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist*, 149, 3: 369-399
- Schweiger P. F., Rouhier, H., Eacute, Söderström, B. 2002. Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy. *Mycological Research*, 106, 3: 349-354
- Selosse M.-A., Richard, F., He, X., Simard, S. W. 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 11: 621-628
- Simard S. W., Perry, D. A., Jones, M. D., Myrold, D. D., Durall, D. M., Molina, R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, 388: 579-582
- Smalla K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C. C. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, 69, 3: 470-479
- Smith M. E., Henkel, T. W., Catherine Aime, M., Fremier, A. K., Vilgalys, R. 2011. Ectomycorrhizal fungal diversity and community structure on three co-occurring leguminous canopy tree species in a Neotropical rainforest. *New Phytologist*, 192, 3: 699-712
- Smith S. E., Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd edition. London, Academic Press: 1-385
- Stempak J. G., Ward, R. T. 1964. An improved staining for electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 22, 3: 697-701
- Štraus I. 2010. Tipi ektomikorize pri sadikah bukev (*Fagus sylvatica* L.) v rizotronih. Diplomsko delo. (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo). Ljubljana, samozal.: 1-107

- Štraus I., Martinović, T., Železnik, P., Kraigher, H. 2012. Obrat drobnih korenin pri *Fagus sylvatica* L. in analiza z računalniškim programom Rootfly[®]. Les = Wood : revija o lesu in pohištvu, 64, 5: 136-141
- Štraus I. A., Bajc, M., Grebenc, T., Mali, B., Kraigher, H. 2011. Tipi ektomikorize pri sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) v rizotronih. Zbornik gozdarsvta in lesarstva, 95: 23-36
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. Molecular Biology and Evolution, 9, 4: 678-687
- Tamura K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, 28, 2731-2739:
- Tamura K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725-2729
- Taylor A. F. S., Fransson, P. M., Högborg, P., Högborg, M. N., Plamboeck, A. H. 2003. Species level patterns in ¹³C and ¹⁵N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. New Phytologist, 159, 3: 757-774
- Tedersoo L., Hansen, K., Perry, B. A., Kjoller, R. 2006. Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. New Phytologist, 170, 3: 581-596
- Tibbett M., Cairney, J. W. G. 2007. The cooler side of mycorrhizas: their occurrence and functioning at low temperatures. Canadian Journal of Botany, 85, 1: 51-62
- Tingey D. T., Phillips, D. L., Johnson, M. G., Rygiewicz, P. T., Beedlow, P. A., Hogsett, W. E. 2005. Estimates of Douglas-fir fine root production and mortality from minirhizotrons. Forest Ecology and Management, 204, 2–3: 359-370
- Van Der Heijden M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I. R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, 396: 69-72
- Vargas R., Allen, M. F. 2008. Dynamics of Fine Root, Fungal Rhizomorphs, and Soil Respiration in a Mixed Temperate Forest: Integrating Sensors and Observations. Vadose Zone J., 7, 3: 1055-1064

- Vierheilig H., Schweiger, P., Brundrett, M. 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots†. *Physiologia Plantarum*, 125, 4: 393-404
- Vitasse Y., Bresson, C. C., Kremer, A., Michalet, R., Delzon, S. 2010. Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, 24, 6: 1211-1218
- Von Wühlisch G. 2008. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for European beech (*Fagus sylvatica*). *Biodiversity International*: 1-6
- Wallander H., Ekblad, A., Godbold, D. L., Johnson, D., Bahr, A., Baldrian, P., Björk, R. G., Kieliszewska-Rokicka, B., Kjoller, R., Kraigher, H., Plassard, C., Rudawska, M. 2013. Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 57: 1034-1047
- Wallander H., Göransson, H., Rosengren, U. 2004. Production, standing biomass and natural abundance of 15N and 13C in ectomycorrhizal mycelia collected at different soil depths in two forest types. *Oecologia*, 139, 1: 89-97
- Wallander H., Johansson, L., Pallon, J. 2002. PIXE analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different minerals in forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 2: 147-156
- Wallander H., Nilsson, L. O., Hagerberg, D., Bååth, E. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist*, 151, 3: 753-760
- Way D. A., Oren, R. 2010. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree Physiology*, 30, 6: 669-688
- Wayne P. M., Reekie, E. G., Bazzaz, F. A. 1998. Elevated CO₂ ameliorates birch response to high temperature and frost stress: implications for modeling climate-induced geographic range shifts. *Oecologia*, 114, 3: 335-342
- Weigt R., Raidl, S., Verma, R., Agerer, R. 2012. Exploration type-specific standard values of extramatrical mycelium – a step towards quantifying ectomycorrhizal space occupation and biomass in natural soil. *Mycological Progress*, 11, 1: 287-297

- Weigt R., Raidl, S., Verma, R., Rodenkirchen, H., Göttlein, A., Agerer, R. 2011. Effects of twice-ambient carbon dioxide and nitrogen amendment on biomass, nutrient contents and carbon costs of Norway spruce seedlings as influenced by mycorrhization with *Piloderma croceum* and *Tomentellopsis submollis*. *Mycorrhiza*, 21, 5: 375-391
- Weiner J. 2004. Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 6, 4: 207-215
- Wells C. E., Birchfield, S. T. 2011. Rootfly: Software for Minirhizotron Image Analysis (Version 2.0.2.) [Computer software]., Clemson University, GNU General Public License. Retrieved January 22, 2012.
- Wertin T. M., Mcguire, M. A., Teskey, R. O. 2011. Higher growth temperatures decreased net carbon assimilation and biomass accumulation of northern red oak seedlings near the southern limit of the species range. *Tree Physiology*, 31,12: 1277-1288
- White T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis M., Gelfand D., Shinsky J. in White T. (Ur.). 1990. New York, Academic Press: 315-322
- Wilhelm S., Grobler, B., Gluch, M., Heinz, H. 2014. Confocal laser scanning microscopy principles. *Microscopy from Carl Zeiss*. Zeiss. Jena: 1-30
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/laserconfocal.html> (22. jun. 2014)
- Zelevnik P., Hrenko, M., Then, C., Koch, N., Grebenc, T., Levanic, 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, 2: 298-308
- Zeller B., Brechet, C., Maurice, J.-P., Le Tacon, F. 2007. ¹³C and ¹⁵N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Annals of Forest Science*, 64, 4: 419-429
- Zhou Y., Tang, J., Melillo, J. M., Butler, S., Mohan, J. E. 2011. Root standing crop and chemistry after six years of soil warming in a temperate forest. *Tree Physiology*, 31, 7: 707-717

ZAHVALA

Zahvalila bi se vsem, ki so pomagali pri nastanku doktorske naloge. Še posebej bi se zahvalila:

- mentorici, prof. dr. Hojki Kraigher, ki mi je omogočila opravljati doktorsko nalogo na Gozdarskem inštitutu Slovenije, za konstruktivne razprave in nasvete pri pisanju, za možnosti potovanj v tujino, kjer sem pridobila številna nova znanja tekom študija in za vključevanja v številne projekte na katerih sem lahko širila znanje in pridobivala nove izkušnje;
- so-mentorju, prof. dr. Marku Kreft, za pomoč pri delu s konfokalnim mikroskopom, pri analizi slik in interpretaciji rezultatov ter za ostale koristne nasvete tekom dela;
- članicam komisije za hitro in temeljito recenzijo;
- dr. Tinetu Grebenc za pomoč pri identifikaciji ECM gliv iz rodu *Tuber* sp.;
- dr. Tanji Mrak za pomoč pri analizah in ostale nasvete tekom mojega dela;
- dr. Petru Železnik za pomoč pri delu s programom WinRhizo;
- dr. Mitji Ferlan za vzpostavitev avtomatskega sistema beleženja podatkov v rizotronih in za pomoč pri analizi in interpretaciji rezultatov CO₂ analiz;
- Marku Bajc za izvedbo in interpretacijo DGGE analiz in za pomoč pri filogenetskih analizah;
- Domnu Finžgar za pomoč pri statistični analizi s programom PSPP;
- Meliti Hrenko in Barbari Štupar za pomoč pri identifikaciji ECM gliv na sadikah in pri molekulskih analizah;
- študentkama Moniki Šegula in Tijani Martinović za pomoč pri šteju in tehtanju korenin
- Mateju in Roku za podporo.

PRILOGE

PRILOGA A

Rezultati primerjav (BLASTn) nukleotidnih zaporedij ektomikoriznih gliv iz poskusa z
nukleotidnimi zaporedji iz spletne baze podatkov GenBank

Priloga A1: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vrst iz rodu *Scleroderma*.

18-5_2RaBu45	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JX030288.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	100%	100 %
	emb FM213352.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	100 %	100 %
	gb EU819438.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	100 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v vrsto <i>Scleroderma areolatum</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-5_2RaBu45 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
31-25_2DHLBu8	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JX030288.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	emb FM213352.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	gb GQ166910.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v vrsto <i>Scleroderma areolatum</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 31-25_2DHLBu8 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
27-3_1RABu35	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
	gb EU784416.1 	<i>Scleroderma verrucosum</i>	99 %	100 %
	gb JX030282.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

27-3_1RABu35	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 27-3_1RABu35 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
30-1_2DHLBu10zg	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	100 %	100 %
	gb JX030288.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	emb FM213352.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 30-1_2DHLBu10zg v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
31-23_1RABu47	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
	gb JX030288.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	emb FM213352.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 31-23_1RABu47 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
27-1_3DHLBu15	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
	emb HF933231.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	gb JX030288.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

27-1_3DHLBu15	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 27-1_3DHLBu15 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
27-4_1RABu43	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb FJ196958.1 	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Scleroderma</i>)	99 %	100 %
	gb GQ221643.1 	Uncultured <i>Scleroderma</i> clone	99 %	100 %
	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 27-4_1RABu43 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18-22_2NHLBu19	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU246991.1 	Uncultured <i>Scleroderma</i> isolate	99 %	100 %
	gb EU784407.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-22_2NHLBu19 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18-23_1DHLBu5zg	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

18-23_1DHLBu5zg	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
	gb EU784416.1 	<i>Scleroderma verrucosum</i>	99 %	100 %
	gb JX030282.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-23_1DHLBu5zg v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18-18_1LOBu113zg	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	100 %
	emb HF933231.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	100 %
	gb GU181838.1 	Uncultured <i>Scleroderma</i> clone	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-18_1LOBu113zg v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
30-14_1DHLBu16	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	98 %
	gb EU784416.1 	<i>Scleroderma verrucosum</i>	98 %	98 %
	gb JX030282.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	98 %	98 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 30-14_1DHLBu16 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

18-31_3DHLBu4	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU246991.1 	Uncultured Scleroderma isolate	99 %	91 %
	gb EU784407.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	99 %	91 %
	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	91 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-31_3DHLBu4 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18-13_1NHLBu30	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	98 %
	gb JX474854.1 	Uncultured Scleroderma clone	99 %	98 %
	gb EU784416.1 	<i>Scleroderma verrucosum</i>	99 %	98 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-13_1NHLBu30 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
28-12_1RABu42	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	93 %	98 %
	emb FM213353.1 	<i>Scleroderma areolatum</i>	93 %	98 %
	gb FJ196958.1 	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Scleroderma</i>) clone	93 %	98 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 28-12_1RABu42 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

30-29_1NHLBu28	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb FJ196958.1 	Uncultured ectomycorrhiza (<i>Scleroderma</i>) clone	96 %	100 %
	gb GQ221643.1 	Uncultured <i>Scleroderma</i> clone	95 %	100 %
	emb HE820325.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	95 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 30-29_1NHLBu28 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
31-5_1NHLBu33	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	emb HF933241.1 	<i>Scleroderma verrucosum</i>	100 %	100 %
	emb HF933232.1 	<i>Scleroderma verrucosum</i>	100 %	100 %
	emb FM213354.1 	<i>Scleroderma cepa</i>	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Scleroderma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 31-5_1NHLBu33 v rodu <i>Scleroderma</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

Priloga A2: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vrst iz rodu *Tuber*.

18_1-1LOBu129	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_1-1LOBu129 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_3-1RABu48	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_3-1RABu48 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_4-1RABu45	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_4-1RABu45 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_6-1DHLBu17	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb DQ069050.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	99 %
	gb KF742744.1 	<i>Tuber</i> sp.	99 %	100 %
	gb EU379679.1 	<i>Tuber</i> sp.	99 %	100 %

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

18_6-1DHLBu17	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_6-1DHLBu17 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_10-5DHLBu15	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	99 %	98 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	99 %	98 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	98 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_10-5DHLBu15 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_11-3NHLBu23	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	100 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_11-3NHLBu23 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_12-1DHLBu2	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_12-1DHLBu2 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

18_20-1LOBu55	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_20-1LOBu55 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_25-2DHLBu5	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	99 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	99 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	100 %	99 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_25-2DHLBu5 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_29-1DHLBu4	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	99 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	99 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_29-1DHLBu4 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_30-2DHLBu4	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	99 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	99 %	100 %
	gb JX316500.1 	Fungal sp.	99 %	100 %

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

18_30-2DHLBu4	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_30-2DHLBu4 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_32-4DHLBu4	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	100 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	100 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	100 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_32-4DHLBu4 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				
18_33-1DHLBu15	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb KF742730.1 	<i>Tuber</i> sp.	99 %	100 %
	gb JX898975.1 	Uncultured <i>Tuber</i> clone	99 %	100 %
	gb JQ925632.1 	Fungal sp.	99 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Tuber</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18_33-1DHLBu15 v rodu <i>Tuber</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

Priloga A3: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vrst iz rodu *Peziza*.

31-8_1LOBu130	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JX316563.1 	Uncultured fungus clone	99 %	100 %
	gb GU969261.1 	Uncultured <i>Peziza</i> morphotype	99 %	100 %
	gb JN102423.1 	Pezizaceae sp.	99 %	99 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Peziza</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 31-8_1LOBu130 v rodu <i>Peziza</i> , smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

Priloga A4: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vrst iz rodu *Hebeloma*.

18-35_4DHLBu15	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb EF644106.1 	<i>Hebeloma mesophaeum</i>	99 %	99 %
	gb FJ197932.1 	Uncultured <i>Hebeloma</i> clone	99 %	99 %
	gb GQ478006.1 	Uncultured ectomycorrhizal fungus	99 %	99 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Hebeloma</i> . Natančnejšo umestitev glive, katere rDNA regijo smo pomnožili v vzorcu 18-35_4DHLBu15 v rodu <i>Hebeloma</i> smo ugotavljali s filogenetsko analizo.				

Priloga A5: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vrst iz rodu *Pulvinula*.

18-8_1NHLBu23	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured <i>Pulvinula</i> clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

28-5_5DHLBu14	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured Pulvinula clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				
30-28_DHLBu3	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured Pulvinula clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				
30-8_1NHLBu27	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured Pulvinula clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				
30-11_4NHLBu27	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured Pulvinula clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	95 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

30-11_4NHLBu27	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				
31-27_1RABu64	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured <i>Pulvinula</i> clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				
30-4_4DHLBu1	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured <i>Pulvinula</i> clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				
30-15_1NHLBu24	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured <i>Pulvinula</i> clone	99 %	100 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	99 %	93 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	96 %	96 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

18-7_2DHLBu17	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb JN704812.1 	Uncultured Pulvinula clone	100 %	93 %
	gb FJ210748.1 	Uncultured Pyronemataceae clone	100 %	71 %
	gb KF617886.1 	Uncultured fungus clone	100 %	100 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Pulvinula</i> .				

Priloga A6: Rezultat primerjav (BLASTn) nukleotidnega zaporedja vrst iz rodu *Trichophaea*.

18-14_2NHLBu30(zg)	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	80 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
27-2_4DHLBu14	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	100 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	88 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	92 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
28-3_2DHLBu14	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	100 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	88 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	92 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

31-6_2NHLBu33	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	80 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
32-4_1NHLBu32	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
32-5_2NHLBu32	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

32-6_3NHLBu32	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
32-9_2NHLBu34	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
32-10_5NHLBu32	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				

“se nadaljuje”

“nadaljevanje”

31-17_4NHLBu31	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	80 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
28-4_3DHLBu14	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	99 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	87 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	91 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				
32-8_1NHLBu34	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				

“se nadaljuje”

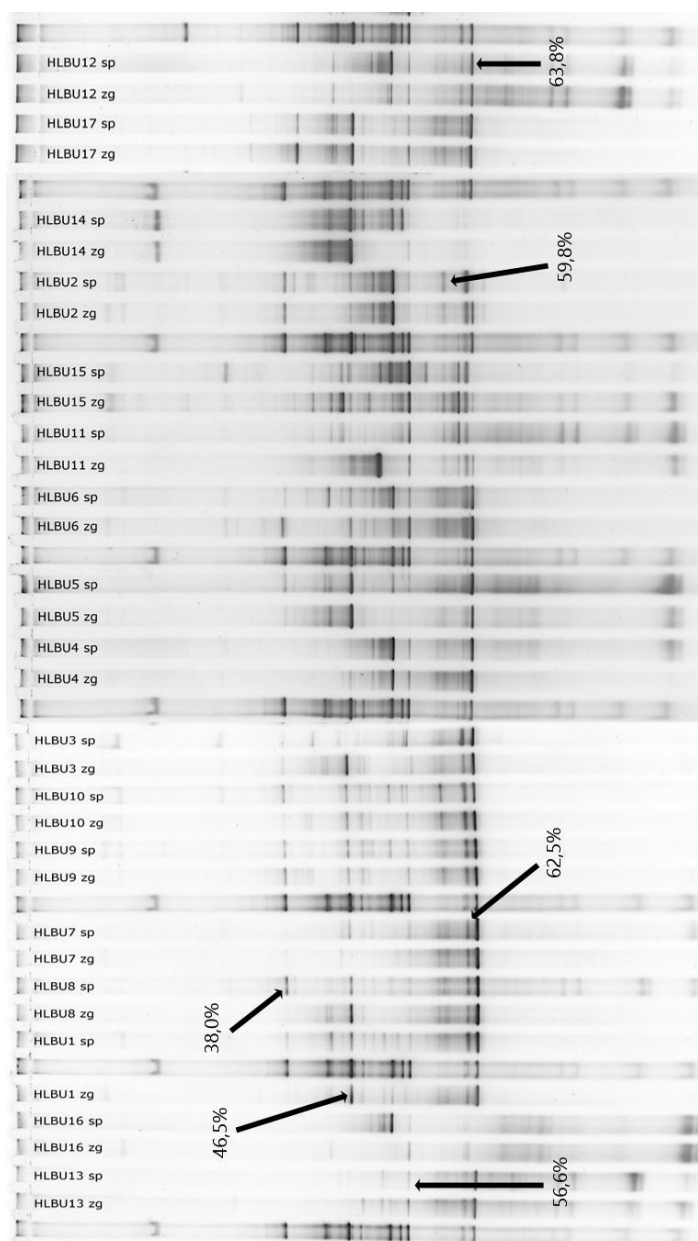
“nadaljevanje”

31-15_2NHLBu31	Šifra zaporedja	Opis vzorca	Identičnost (<i>angl. Identity</i>)	Pokritost (<i>angl. Query coverage</i>)
Najbližji zadetki GenBank	gb GU327411.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	98 %
	gb JX474835.1 	Uncultured Trichophaea clone	99 %	86 %
	gb AY351623.1 	Uncultured ectomycorrhiza (Pyronemataceae)	99 %	90 %
Komentar: Najbližji zadetki iz baze podatkov so sekvence gliv, ki se uvrščajo v rod <i>Trichophaea</i> .				

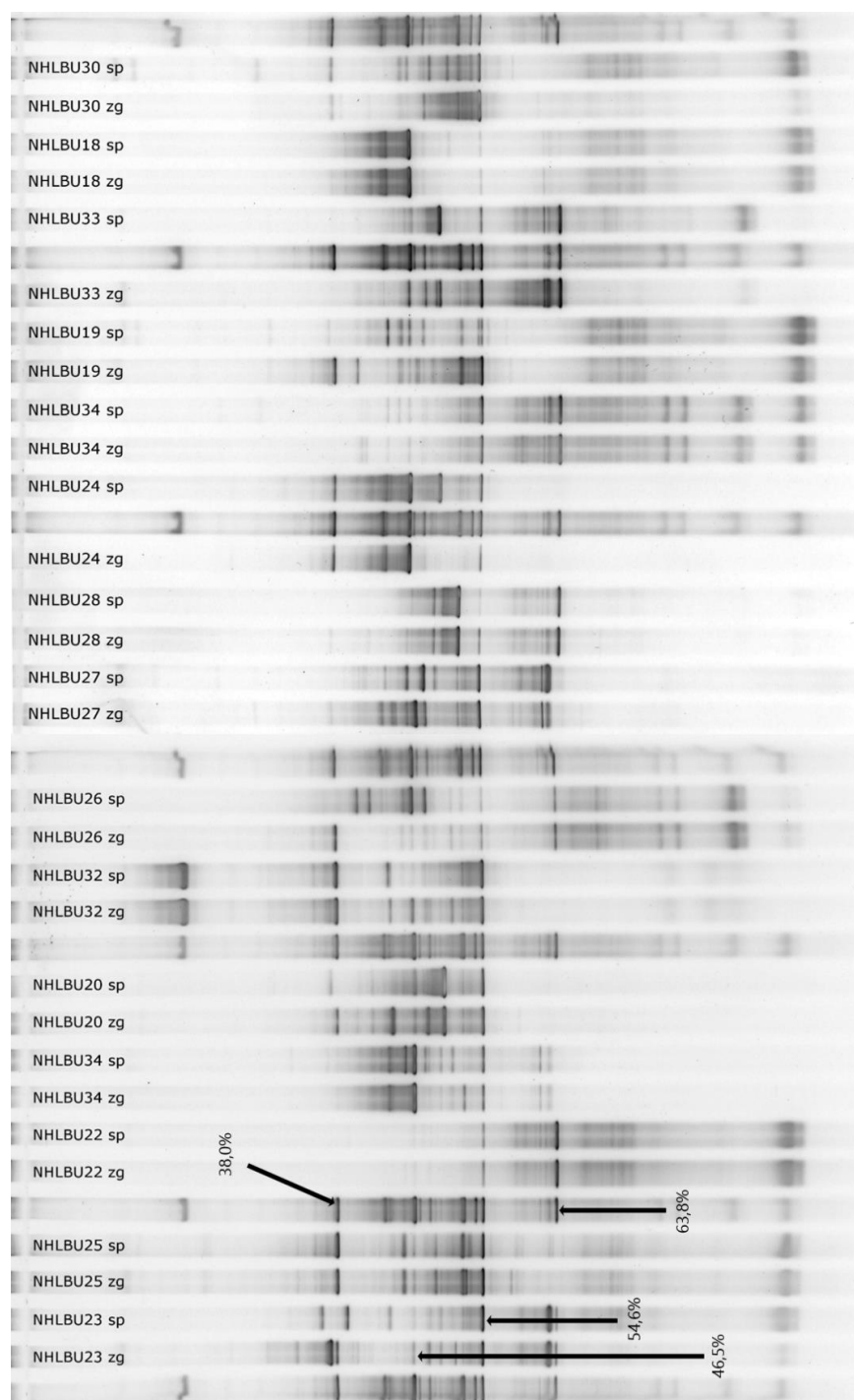
PRILOGA B

Rezultati analize DGGE

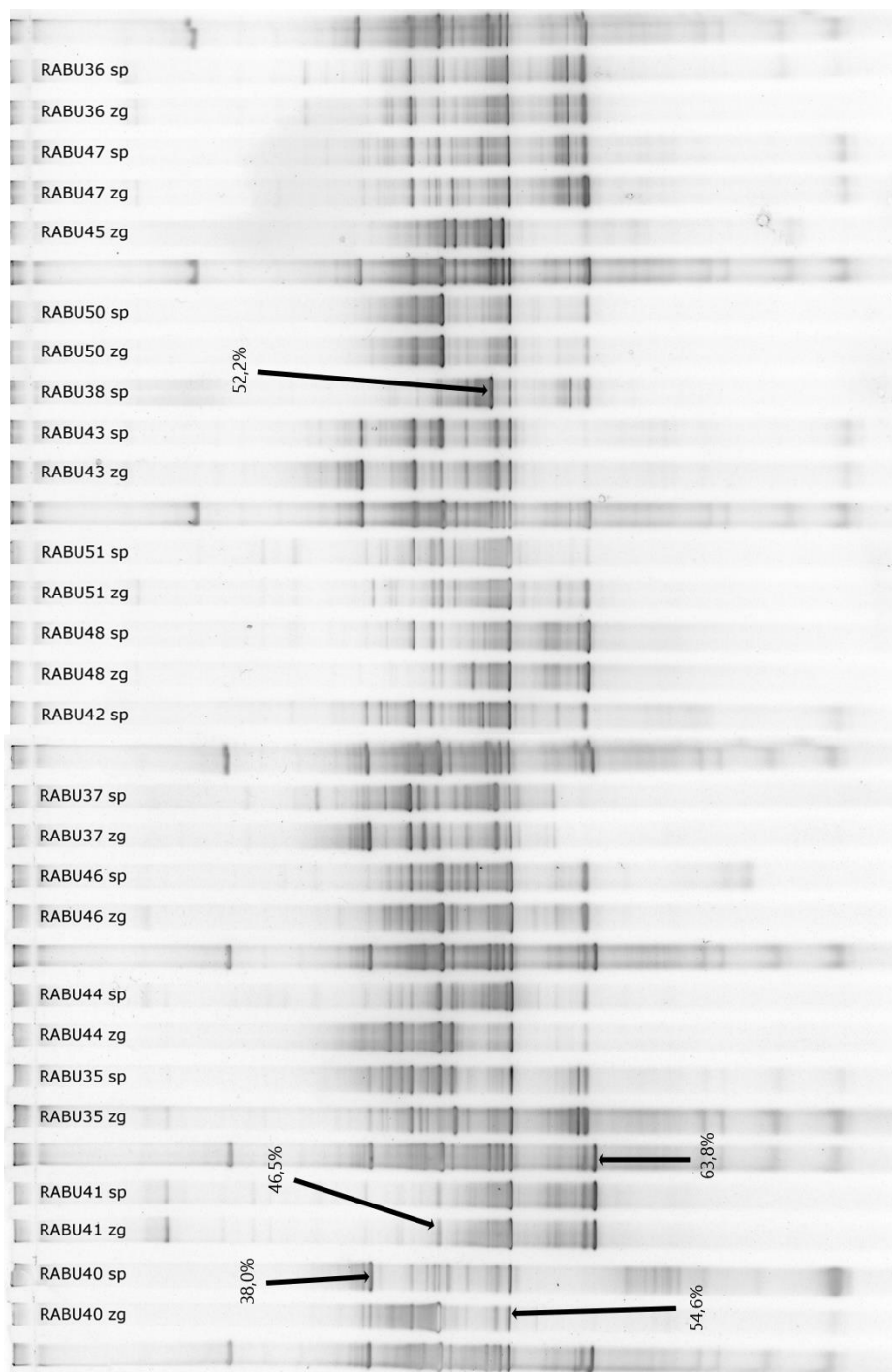
Priloga B2: Rezultat analize vzorcev substrata iz tretmaja v klimatizirani komori (15-20 °C) z dodatnim hlajenjem korenin (CR+) z metodo DGGE. Na sliki so s puščico označene lise, ki so za omenjeni tretma bolj pomembne.



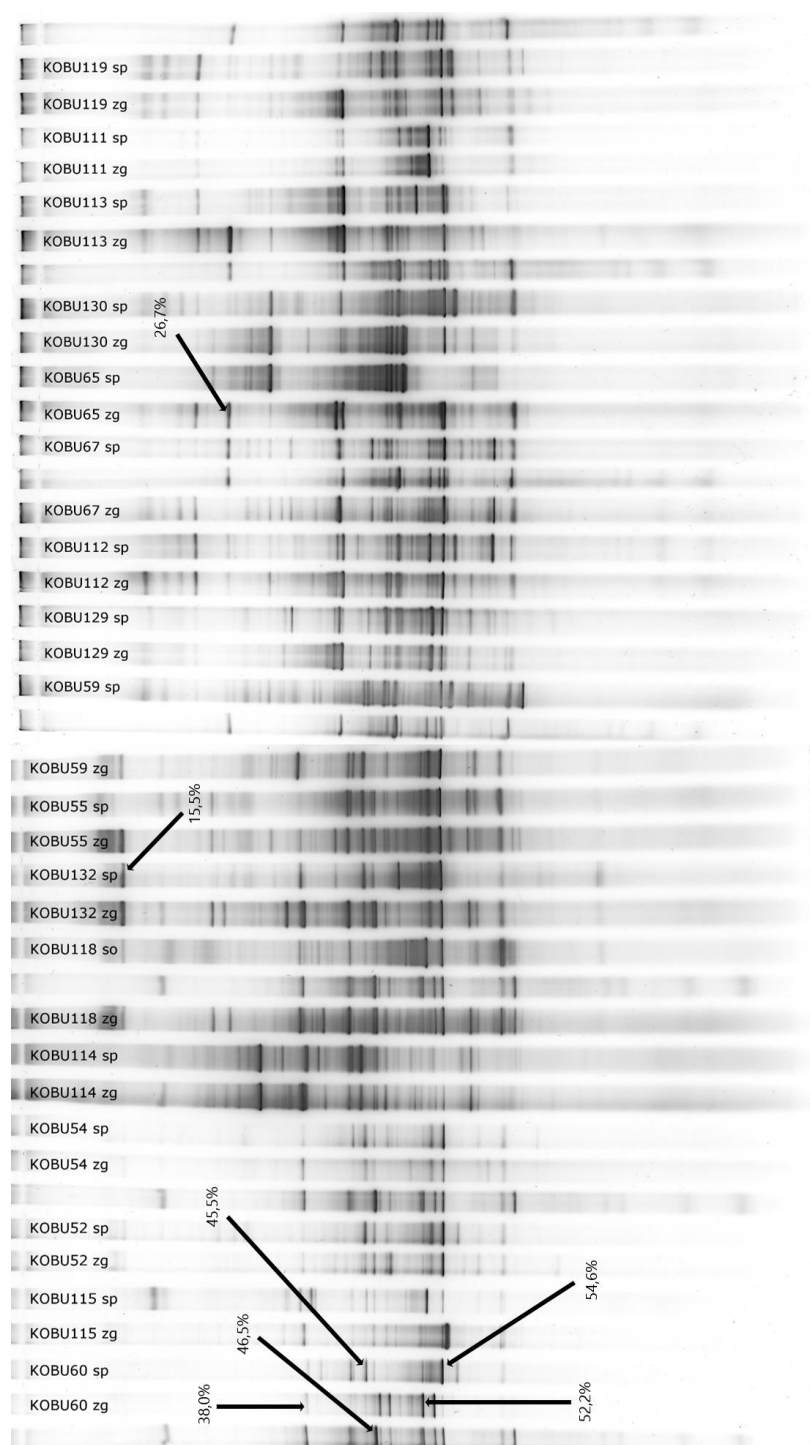
Priloga B2: Rezultat analize vzorcev substrata iz tretmaja v klimatizirani komori (15-20 °C) brez dodatnega hlajenja korenin (CR-) z metodo DGGE. Na sliki so s puščico označene lise, ki so za omenjeni tretma bolj pomembne.



Priloga B3: Rezultat analize vzorcev substrata iz tretmaja v rastlinjaku (GH) z metodo DGGE. Na sliki so s puščico označene lise, ki so za omenjeni tretma bolj pomembne.



Priloga B4: Rezultat analize vzorcev substrata iz tretmaja zunaj (OUT) z metodo DGGE. Na sliki so s puščico označene lise, ki so za omenjeni tretma bolj pomembne.



PRILOGA C

Rezultati analize vpliva temperature in povišane koncentracije CO₂ na pestrost ECM gliv z metodo multiple regresije

R	R-kvadrat	Prilagojeni R-kvadrat	Standarna napaka
0,70	0,49	0,48	1,04

	Nestandardni koeficient		Standardizirani koeficient	t	p
	B	Standardna napaka	Beta		
(konstanta)	-2,57	0,80	0,001	-3,23	0,002
Temperatura	-0,10	0,04	-0,24	-2,35	0,022
CO₂	0,01	0,001	0,78	7,57	0,0001

PRILOGA D

Rezultati analize vpliva eksploracijskih tipov na maso nadzemnega dela sadik bukve z metodo multiple regresije

R	R-kvadrat	Prilagojeni R-kvadrat	Standarna napaka
0,76	0,58	0,55	3,99

	Nestandardni koeficient		Standardizirani koeficient	t	p
	B	Standardna napaka	Beta		
(konstanta)	2,22	0,83	0,001	2,67	0,010
CT ET	2,49	0,46	0,47	5,36	0,0001
SD ET	1,07	1,15	0,08	0,93	0,355
MD ET	2,11	2,96	0,06	0,71	0,479
LD ET	5,92	1,05	0,50	5,62	0,0001

PRILOGA E

Rezultati analize vpliva eksploracijskih tipov na maso podzemnega dela sadik bukve z
metodo multiple regresije

R	R-kvadrat	Prilagojeni R-kvadrat	Standarna napaka
0,73	0,53	0,50	3,71

	Nestandardni koeficient		Standardizirani koeficient	t	p
	B	Standardna napaka	Beta		
(konstanta)	1,67	0,77	0,001	2,17	0,034
CT ET	2,05	0,43	0,44	4,76	0,0001
SD ET	0,21	1,07	0,02	0,20	0,844
MD ET	3,79	2,76	0,12	1,38	0,174
LD ET	5,02	0,98	0,48	5,13	0,0001