

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN OBNOVLJIVE GOZDNE
VIRE

Domen FINŽGAR

**VPLIV GLIV NA RAZKROJ VELIKIH LESNIH
OSTANKOV BUKVE V PRAGOZDNEM
REZERVATU RAJHENAVSKI ROG**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

Domen FINŽGAR

**VPLIV GLIV NA RAZKROJ VELIKIH LESNIH OSTANKOV BUKVE
V PRAGOZDNEM REZERVATU RAJHENAVSKI ROG**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij – 1. stopnja

**THE ROLE OF FUNGI IN THE DECAY OF COARSE WOODY
DEBRIS OF EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA* L.) IN THE
FOREST RESERVE RAJHENAVSKI ROG**

B. Sc. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija gozdarstva na Oddelku za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete. Opravljeno je bilo na Oddelku za gozdno fiziologijo in genetiko Gozdarskega inštituta Slovenije.

Študijska komisija Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete je na seji dne 1. junija 2012 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Hojko Kraigher.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Domen Finžgar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	172.8+228.81(497.4Rajhenavski rog)(043.2)=163.6
KG	bukev/DGGE/gostota/glive/Rajhenav/VLO/voda/živo srebro/
AV	FINŽGAR, Domen
SA	KRAIGHER, Hojka (mentor)
KZ	SI-1001 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
LI	2013
IN	VPLIV GLIV NA RAZKROJ VELIKIH LESNIH OSTANKOV BUKVE V PRAGOZDNEM REZERVATU RAJHENAVSKI ROG
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij – 1 stopnja)
OP	XII, 48 str., 7 pregl., 21 sl., 4 pril., 50 vir.
AI	Ugotavljanje vpliva gliv na razgradnjo velikih lesnih ostankov (VLO) v pragozdnem rezervatu smo razčlenili na dva dela. Prvi se je ukvarjal z ugotavljanjem zmanjševanja gostot VLO s stopnjo razgradnje, drugi pa z opisom pojavnosti gliv v vzorcih VLO z metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturantov (DGGE). Z namenom ugotavljanja zanesljivosti drugačnih, zdravju varnejših metod od živosrebrne metode, tudi na vodnem volumometru. Pri tem je bila pilotno uporabljena tehtnica Sartorius MSA 323S z dodatkom za merjenje gostot YDK01. Merili smo osnovne, nasičene in absolutne gostote. Po pričakovanjih sta nasičeni in osnovni gostoti pokazali trend padanja gostot. Tehtnica Sartorius se je izkazala za zanesljivo in hitro metodo merjenja gostot v vodi, ki pa jo bo potrebno še optimizirati. Molekularne metode ugotavljanja prisotnosti gliv v VLO so v Sloveniji v razvoju. Na podlagi ekstrakcije glivne DNA iz vzorcev VLO smo s pomočjo analitske metode DGGE uspeli pridobiti profile združb gliv za posamezni vzorec. Rezultati so pokazali, da so nekatere glive značilne za začetne stopnje razkroja, druge pa za končne stopnje. Pestrost profilov se s stopnjo razkroja večja, odstopa le stopnja razkroja 1, ki ima nepričakovano veliko stopnjo pestrosti. Razvrstitev vzorcev glede na podobnost DGGE profilov ni bila skladna z razvrstitvijo v stopnje razgradnje, variabilnosti med vzorci znotraj stopenj razgradnje je bila visoka. Povezave med genetskimi in geografskimi razdaljami niso bile ugotovljene.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Du1
- DC $FDC\ 172.8+228.81(497.4Rajhenavski\ rog)(043.2)=163.6$
- CX beech/CWD/DGGE/density/fungi/mercury/Rajhenav/water/
- AU FINŽGAR, Domen
- AA KRAIGHER, Hojka (menthor)
- PP SI-1001 Ljubljana, Večna pot 83
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Forestry and Renewable Forest Resources
- PY 2013
- TI THE ROLE OF FUNGI IN THE DECAY OF COARSE WOODY DEBRIS OF EUROPEAN BEECH (*FAGUS SYLVATICA* L.) IN THE FOREST RESERVE RAJHENAVSKI ROG
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij – 1 stopnja)
- OP XII, 48 p., 7 tab., 21 fig., 4 ann., 50 ref.
- AI Researching the role of fungi in the decay of coarse woody debris (CWD) of European beech was divided in two parts. Determining the loss of CWD density during decay was done in part one, while the second part investigated the distribution and succession of fungi in the decaying CWD, using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). To study the suitability of other, less toxic, density measuring techniques than the standard mercury one, samples were measured in a mercury medium as well as in a water medium. For water measurements we used Sartorius MSA 323S scale with YDK01 Density Determination Kit for the first time in our labs. We measured basic, absolute and saturated densities. Lower densities in higher decay phases were detected, as expected. The YDK01 Density Determination Kit proved to be a reliable method of measuring wood sample densities in water. However, some optimizations will have to be considered in the future. Molecular methods for studying fungi in CWD are in Slovenia still in early phases. Based on DNA extracted from fungi inside CWD, we conducted a DGGE analysis, resulting in fungi community profiles for each sample. According to the results, different decay stages host different types of fungi species. The number of fungi species per sample increases with higher decay phases. Genetic distances determined from DGGE profiles and geographic distances were not in high correlation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG.....	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GOSTOTE VLO	3
2.2 SUKCESIJA IN DIVERZITETA GLIV V RAZGRAJUJOČIH SE VLO	4
3 CILJI NALOGE IN HIPOTEZE	9
4 MATERIAL IN METODE.....	10
4.1. RAJHENAVSKI ROG	10
4.2 DOLOČEVANJE STOPENJ RAZGRADNJE VLO	10
4.3 GOSTOTE VLO	11
4.3.1 Statistična obdelava rezultatov meritve gostot.....	14
4.4 SUKCESIJA IN DIVERZITETA GLIV V RAZGRAJUJOČIH SE VLO	15

4.4.1 Statistična obdelava rezultatov DGGE	19
5 REZULTATI Z RAZPRAVO	21
5.1 GOSTOTE VLO	21
5.2 SUKCESIJA IN DIVERZITETA GLIV V RAZGRAJUJOČIH SE VLO	26
5.2.1 Pregled rezultatov DGGE	26
5.2.2 Razvrščanje v skupine na podlagi Diceovih koeficientov	34
5.2.3 Ugotavljanje odvisnosti genetskih in geografskih razdalj	34
5.2.3.1 Mantelov test	34
5.2.3.2 Montmonierjev Test.....	35
5.2.3.2 Test SAMOVA	36
6 SKLEPI	37
6.1 GOSTOTE VLO	37
6.2 PESTROST GLIVNIH ZDRUŽB.....	38
7 POVZETEK.....	41
8 VIRI.....	43
9 ZAHVALA.....	1
10 PRILOGE	1

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava prednosti in slabosti klasičnih in molekularnih metod. Strnjena po članku Classical Methods and Moderna Analysis for Studying Fungal Diversity (Schmit in Lodge, 2005).....	5
Preglednica 2: Šeststopenjska lestvica faz razkroja (Kraigher in sod., 2002).....	11
Preglednica 3: Razlike volumnov merjenih s Sartorius MSA 323S (merjen volumen (H ₂ O) in izračunanih volumnov, osmih testnih vzorcev	21
Preglednica 4: Povprečne vrednosti in standardni odklon (SD) različnih gostot po fazah razkroja.....	22
Preglednica 5: P (sig.) vrednosti Kruskal-wallis in Mann-Whitney U testov	24
Preglednica 6: F _{st} vrednosti med posameznimi stopnjami razgradnje.....	30
Preglednica 7: F _{st} vrednosti med posameznimi globinskimi profili	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Število vrst glede na stopnjo razgradnje navadne smreke (<i>Picea abies</i> (L.) Karst) v borealnem gozdu (Stenlid in sod., 2008)	7
Slika 2: Vrstna pestrost gliv glede na razkrojno fazo lesnih ostankov navadne bukve (<i>Fagus sylvatica</i> L.) na ploskvah Rajhenavski Rog in Krokar (Grebenc in sod. 2009:49)	7
Slika 3: Povprečne vrednosti števila gliv luknjičark in lističark v različnih stopnjah razkroja CWD navadne smreke (<i>Picea abies</i> (L.) Karst) v borealnem gozdu (Sotkland in Siitonen, 2012).....	8
Slika 4: Primerjava identifikacije glivnih vrst z metodo a) DNA identifikacija iz kultur micelija (Mycelial Cultures), identifikacija trosišč (Sporocarps), identifikacija preko ITS regije (ITS T-RFLP) in lokacijo b) na vejah (Branches), na vrhu drevesa (Tops) in na panjih (Stumps) (Allmér in sod., 2006:62).....	8
Slika 5: Slika 1 Primeri vzorcev, na katerih so bile opravljene meritve gostot. Označeni so z ID oznako in fazo razkroja, ločeno z vejico (foto: Domen Finžgar, 2013).....	12
Slika 6: Tehnica Sartorius MSA 323S z dodatkom za merjenje gostot YDK01 (foto: Domen Finžgar, 2012)	13
Slika 7: Potek dela na ugotavljanju sukcesije gliv v VLO: od vzorčenja na terenu (a, b), do tehtanja pit in ugotavljanja globinskih profilov vzorcev (c), vrtanja v globinske profile (d,e) in nenazadnje do ekstrakcije glivne DNA (f) (foto: Domen Finžgar, 2012-2013).....	15
Slika 8: Način pridobivanja »tretjinskih« globinskih profilov (a), sekanje globinskega profila na polovico, z namenom pridobivanja »nedotaknjene« površine za vrtanje (b) (Ilustracija: Domen Finžgar, 2013).....	16

Slika 9: Rezultat DGGE je gel, ki prikazuje različno ločene pasove. Vsak stolpec v gelu predstavlja določen vzorec (npr. 201/3/A). Na sliki so jasno vidni tudi enako pestri stolpci v enakih razmakih od prvega stolpca dalje. To so standardi, ki omogočajo normalizacijo različnih gelov. Na sliki vidimo manj pester gel, druge stopnje razgradnje (a) in bolj pester gel v peti stopnji razgradnje (b).	18
Slika 10: Diagram box plot, ki prikazuje vrednosti osnovnih gostot, merjenih v vodi, po fazah razkroja	23
Slika 11: Diagram box plot, ki prikazuje vrednosti nasičenih gostot, merjenih v vodi, po fazah razkroja	23
Slika 12: Diagram box plot, ki prikazuje vrednosti absolutnih gostot, merjenih v živem srebru, po fazah razkroja	24
Slika 13: Povprečno število pasov na stopnjo razgradnje posameznega vzorca (a). Diagram boxplot števila pasov po stopnjah razkroja posameznega vzorca (b).....	26
Slika 14: Porazdelitev števila pasov na odvzetem vzorcu, glede na stopnjo razkroja.....	29
Slika 15: Povprečje števila pasov glede na globinski profil (a), boxplot diagram števila pasov po globinskem profilu (b).....	30
Slika 16: Povprečno število pasov v določeni stopnji razgradnje glede na globinski profil (a) in povprečno število pasov v globinskem profilu glede na posamezno stopnjo razgradnje (b).....	31
Slika 17: Predstavitev petih najpogostejših pasov v določeni stopnji razgradnje (zelena barva). S sivo barvo so označeni ostali prisotni pasovi znotraj unije najpogostejših.....	33
Slika 18: Dendrogram petnajstih VLO označenih z ID in zaporedno številko iz raziskovalne ploskve. Posamezne stopnje razgradnje so označene z različnimi barvami in sicer rumeno (1. st.), rdečo (2. st.), zeleno (3. st.), modro (4. st.) in črno (5. st.).....	34

Slika 19: Prikaz raztrosa dveh matrik: geografskih razdalj in Bray-Curtisovih razdalj.	35
Slika 20: Rezultat Montmonierjevega testa. Izrisanje so bile tri prepreke (z rdečo črto). Vzorci (označeni z zaporednimi številkami), so med seboj ločeni s poligonom. Če si vzorca delita stranico poligona ju program Barrier obravnava kot sosednja vzorca.....	36
Slika 21: Razlogi za odmrtnje drevesa. Indici za odmrtnje zaradi gliv (a): panj je visok približno tretjino drevesne višine, panj je zgoraj odlomljen skorajda horizontalno, pravilno, na panju je ogromno trosnjakov gliv. Indici za odmrtnje zaradi trka z drugim drevesom, ali okoljskih vplivov (b): višina panja je različna, panj je zgoraj odlomljen poševno, nepravilnih oblik, na panju je malo ali nič trosnjakov gliv. Indici za odmrtnje zaradi okoljskih vplivov (c): Panja ni, drevo je izruvano s koreninami, orientacija trosnjakov govori o tem ali so bile glive prisotne že pred odmrtnjem drevesa ali po njem (Ilustracija: Domen Finžgar, 2013)	40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Grafični prikaz popisov stopenj razgradenj iz leta 2002 in 2012.

Priloga B: Grafični prikaz dreves na katerih smo vzorčili analizo DGGE.

Priloga C: Preglednica vseh DGGE vzorcev, po zaporedni številki, DGGE šifri, šifri VLO na terenu, zaporedni številki pite, globinskemu profilu, Stopnji razgradnje in številu pasov na gelu.

Priloga D: Slikovni rezultati DGGE analize. Z rdečimi puščicami so označeni tisti vzorci, ki smo jih zaradi majhnih količin PCR produktov morali na gel nanesti v velikih volumnih (14-20 μ l).

SLOVARČEK

VLO - Veliki Lesni Ostanki. Izraz se uporablja za odmrlo debeljad, ki je v stiku s tlemi, čeprav se v literaturi izraz pogosto uporablja tudi za odmrle panje in debeljad, ki ni v direktem stiku s tlemi. Ustrezna angleška sopomenka je »CWD« ali Coarse woody debris.

DGGE - Analitska tehnika gelske elektroforeze v gradientu denaturantov (DGGE). Pri DGGE metodi se produkti PCR iste velikosti ločujejo na podlagi zmanjšanja elektroforetske mobilnosti v poliakrilamidnem gelu z linearnim gradientom denaturantov DNA (mešanica formamida in uree).

PCR - (ang. Kratica za »Polymerase Chain Reaction«) Verižna reakcija s polimerazo, je metoda, ki omogoča pomnoževanje odsekov DNA *in vitro* s pomočjo encima DNA-polimeraze.

AMOVA - Analiza molekulske variance, ki temelji na poznani analizi variance ANOVA.

1 UVOD

Gozdovi po svetu skladiščijo 120 Gt ogljika, kar je več kot trenutna količina ogljika v atmosferi. Delež ogljika, skladiščenega v gozdovih, predstavlja 77 % ogljika, skladiščenega v zemeljski vegetaciji, od tega deleža je 17 % skladiščenega v gozdovih zmerne pasu, kamor spadajo tudi slovenski gozdovi. Gozdovi prispevajo 90 % k letnemu pretoku ogljika iz atmosfere v kopenske ekosisteme in nazaj v atmosfero. Rast gozdov je ena izmed redkih oblik skladiščenja ogljika na kopnem. V času do kulminacije letnega prirastka drevo predstavlja ponor ogljika. Po kulminaciji sta skladiščenje in sproščanje ogljika nekaj časa v ravnovesju, nato pa se z razgradnjo tkiv drevesa ogljik sprošča nazaj v atmosfero. (Nijnik, 2010).

Razumevanje dinamike razkroja lesa je torej nujno za razumevanje dinamike ogljika. Veliki lesni ostanki (VLO oz. CWD, coarse woody debris) v klimaksnih gozdnih združbah pripomorejo k temu razumevanju, saj so prikaz razkroja lesa kot poteka v naravi, vendar je že ocena deleža biomase VLO v gozdovih problematična zaradi različnih načinov izračuna njenega deleža, kar lahko po navajanju Jonsson in Siitonen (2012) privede do 25-odstotne razlike pri oceni deleža biomase.

Razgradnja VLO je do določene mere znana in s pomočjo eksponentnega modela predvidi časovno zmanjšanje mase, volumna in gostote:

$$Y_t = Y_0 e^{-kt} \quad \dots(1)$$

pri čemer je Y_t gostota v času t , Y_0 začetna gostota pred dekompozicijo in k koeficient dekompozicije, ki ga dobimo z merjenjem relativne dekompozicije večjega števila vzorcev. Glavna pomanjkljivost tega modela je, da predvideva konstantno hitrost dekompozicije lesa skozi čas (Stokland in Siitonen, 2012).

Na dekompozicijo VLO v gozdovih vpliva splet najrazličnejših okoljskih in biotskih dejavnikov. Glive, še posebej vrste znotraj debla Basidiomycota, so najpomembnejši dekompozitorji lesa v gozdnih ekosistemih. Glive med drugim sodelujejo pri najtežjem in

najzapletenejšem procesu razgradnje lesa, razgradnji lignina. Kar trije od štirih glavnih tipov do sedaj znanih skupin encimov (lignin peroksidaze, mangan peroksidaze in raznolike peroksidaze) za razgradnjo lignina, so specifične zgolj za glivne vrste znotraj debla Basidiomycota, ki povzročajo belo trohnobo. (Stokland 2012; Stokland in Siitonen, 2012).

Vrstna sestava dekompozitorjev, ki sodelujejo pri razgradnji lesa, se v času od začetka razkroja do popolne razgradnje spreminja, spreminjajo se tudi njihovi medvrstni odnosi. Razlog zato je predvsem v spremembah fizikalnih in kemijskih lastnosti lesa v sukcesiji razkroja. Tudi sukcesija ni enodimenzionalna. Propadu določene dekompozicijske vrste v razpadajočem lesu ne sledi vedno prihod nove znane vrste, sukcesija ni deterministična, temveč njen potek sledi različnim dekompozicijskim potem (Stokland in Siitonen, 2012). Razvoj glivnih združb v času razkroja lesa se še vedno obravnava, kot eno najbolj determinističnih poti, čeprav si avtorji v tem še niso povsem enotni (Boddy, 2001).

Diplomsko delo Vpliv gliv na razkroj velikih lesnih ostankov bukve v pragozdnem rezervatu Rajhenavski Rog, se dekompozicije VLO loti v dveh metodološko ločenih delih, zaradi česar bo vsako poglavje ločeno na dva dela. Namen prvega dela je ugotavljanje gostote lesa VLO v posamezni stopnji razkroja in namen drugega dela ugotavljanje sukcesije glivnih vrst s spreminjanjem stopnje razkroja VLO.

Del diplomske naloge je že bil objavljen v članku z naslovom Ugotavljanje gostot velikih lesnih ostankov bukve (*Fagus sylvatica* L.) iz pragozdnega rezervata Rajhenavski Rog (Finžgar in sod. 2013)

2 PREGLED OBJAV

2.1 GOSTOTE VLO

Za ugotavljanje hitrosti razkroja VLO je potrebno merjenje gostot v določenih časovnih razmakih. Merjenje gostot lesa otežujejo številne definicije gostot. Navadno merimo **absolutno gostoto** (masa absolutno suhega lesa na volumen absolutno suhega lesa), **osnovno gostoto** (masa absolutno suhega lesa na volumen napojenega lesa) in **zeleno gostoto** (masa svežega lesa na volumen svežega lesa). Ker med navedenimi tremi definicijami gostot ni statistične povezave, je problematična primerjava rezultatov pridobljenih za različne definicije. Obstajajo pa tudi druge definicije gostot (Wagenführ, 1996; Torelli, 1998).

Raziskave so pokazale, da naj bi bila najustreznejša definicija gostote osnovna gostota, (Olesen, 1971; Usta, 2003), saj naj bi rezultati najmanj variirali, če je zagotovljena ustrezna napojitev vzorcev v deionizirani vodi (Olesen, 1971).

V Sloveniji se je pri raziskavah pomena VLO za dinamiko ogljika in biodiverziteto merila absolutna gostota (Kraigher in sod., 2002). Slednjo so na Gozdarskem inštitutu Slovenije doslej določali z Breulovim živosrebrnim volumometrom.

Merjenje gostot lesnih vzorcev z živosrebrnim in vodnim volumometrom sta v gozdarstvu standardna postopka. Vendar je merjenje gostot v živem srebru problematično zaradi zahtev Evropske unije po umiku te nevarne snovi iz človekovega okolja. Tako je z uredbama 1907/2006 in 552/2009 Evropska komisija močno omejila prodajo merilnih naprav, ki vsebujejo živo srebro. Z zadnjim sprejetim amandmajem št. 847/2012, pa je prodajo merilnih naprav z živim srebrom prepovedala tudi v strokovne in industrijske namene. Amandma je začel veljati z dnem 10. 4. 2013 (Uredbe št. 1907/2006, 847/2006 in 847/2012). Primerjave natančnosti merjenja gostot v različnih medijih so vsaj na začetku pokazale, da so meritve, opravljene v živosrebrnem mediju, zanesljivejše (Holz in Plickat, 1961); kasneje se je izkazalo, da se ob uporabi primernih velikosti vzorcev te razlike

zmanjšajo na zanemarljivo vrednost (Olesen, 1971). Podobnega mnenja so tudi na Svetu Evrope, kjer niso predlagali izjem za uporabo živosrebrnih merilnih naprav v lesarstvu in gozdarstvu, kakor so to storili za nekatera medicinska področja (Uredba št. 847/2012).

Raziskave, ki so se ukvarjale s primerjanjem različnih tehnik merjenja gostot, so za svoje vzorce obravnavale zdrav les, pravilnih oblik in znanih dimenzij. Problem torej ostajajo meritve vzorcev, ki so bolj razkrojeni in nepravilnih oblik. Problem nastane tudi, kadar želimo meriti absolutno gostoto, kar v vodnem mediju za tak tip vzorcev sploh ni. Takšni vzorci so pomemben del raziskav VLO, kjer ni možno pridobiti idealnih vzorcev (Kraigher in sod., 2002).

2.2 SUKCESIJA IN DIVERZITETA GLIV V RAZGRAJUJOČIH SE VLO

Sukcesija in pestrost gliv v VLO sta za srednjo in severno Evropo relativno dobro opisani in raziskani (Stokland in Siitonen, 2012). Večina teh raziskav je temeljila na popisu trosišč na terenu in v laboratorijih. Takšne, klasične metode, omogočajo enostavno in poceni identifikacijo velikega števila glivnih vrst. Po drugi strani pa s takšno metodologijo prezremo glive, ki so v lesnem tkivu prisotne zgolj z micelijem, brez trosišč. Zato je realno, skupno število glivnih vrst, vedno večje od zabeleženega (Stokland in Siitonen, 2012).

Vse več raziskav se s sukcesijo in diverziteto gliv ukvarja na molekularni ravni, med drugim tudi s sekvenciranjem DNA, pridobljene iz micelija gliv. Ker gre za mlajšo metodo je njena glavna pomanjkljivost pomanjkanje podatkov v bazah, v katerih še ni dostopna celovita baza sekvenc DNA vseh glivnih vrst. Zaradi tega je primerjava dobljenih rezultatov otežena (Schmit in Lodge, 2005).

Primerjavo prednosti in slabosti klasičnih in molekularnih metod smo povzeli po članku Classical Methods and Modern Analysis for Studying Fungal Diversity (Schmit in Lodge, 2005) in jih strnili v preglednico 1:

Preglednica 1: Primerjava prednosti in slabosti klasičnih in molekularnih metod. Strnjena po članku *Classical Methods and Moderna Analysis for Studying Fungal Diversity* (Schmit in Lodge, 2005)

<i>Prednosti in slabosti</i>	<i>Klasične metode</i>	<i>Molekularne metode</i>
Baza podatkov	Velika	Manjša, a narašča
Podatki o reprodukciji gliv	Metoda nam pove, katere glive se na izbranem vzorcu uspešno razmnožujejo in katere ne	Brez podatkov o reprodukciji
Povezava z okoljskimi podatki (pH, vsebnost hranil, meteorološki podatki,...) na istih vzorcih/ploskvi	Lažja, razvitih je veliko že preizkušenih statističnih metod	Težja zaradi ogromne razlike v velikostnih razredih pridobivanja podatkov. (npr.: primerjava molekularnih podatkov, pridobljenih iz nekaj gramov vzorca s količino padavin!)
Stroški raziskav	Manjši	Večji
Prisotnost reproduktivnih struktur (trošič)	Pomembna za identifikacijo	Nepomembna za identifikacijo
Čas	Za raziskave potrebujemo več časa	Za raziskave potrebujemo manj časa
Znanje	Potrebno je več taksonomskega znanja, identifikacija poteka na podlagi morfolologije	Potrebno je manj taksonomskega znanja, identifikacija poteka na podlagi zaporedja nukleotidov
Pristranskost	Največ pristranskosti izhaja iz odsotnosti trošič, ki bi lahko zagotovila identifikacijo	Največ pristranskosti izhaja iz identifikacije gliv iz izjemno majhne površine vzorca

Ugotavljanje diverzitete gliv s pomočjo molekularnih metod se intenzivno razvija od devetdesetih let dalje. Uspešne so tako za identifikacijo vegetativnih kot reproduktivnih glivnih struktur. Na podlagi takšnih metod raziskovalci odkrivajo nove, vedno bolj raznolike in množične združbe gliv. Z razvojem pomnoževanja tarčnega nukleotidnega zaporedja v reakciji pomnoževanja s polimerazo (PCR), smo dobili več molekularnih metod, primernih za ugotavljanje raznolikosti glivnih združb, med njimi tudi gelsko elektroforezo v gradientu denaturantov (DGGE). (Bidartondo in Gardes, 2005)

Pri DGGE metodi se produkti PCR iste velikosti ločujejo na podlagi zmanjšanja elektroforetske mobilnosti v poliakrilamidnem gelu z linearnim gradientom denaturantov

DNA (mešanica formamida in uree). Ker imajo fragmenti različnih nukleotidnih zaporedij različne temperature denaturacije, se v poliakrilamidnem gelu obnašajo različno (so bolj ali manj mobilni) in se posledično ustavijo na različnih pozicijah v gelu ter tako ločijo med seboj. Rezultat DGGE je gel z različnimi pozicijami in različnimi intenzitetami pasov v njem (Muyzer, 1999).

DGGE se je že pokazal kot primeren način ugotavljanja genetske pestrosti glivnih združb (Anderson in sod., 2003; Bidartondo in Gardes, 2005; Ovaskainen in sod., 2010; Vainio in Hantula, 2000). Eno izmed prvih uporab metode na glivnih združbah je opravil Kowalchuk (1997), z DGGE je proučeval patogene glive v koreninah trav (*Ammophila arenaria* (L.)). Navadno se je analiziralo le število različnih pasov (bogastvo vrst ali »richness«), vse pogosteje pa se analizira tudi njihovo intenziteto in razporeditev (izenačenost ali »evenness«) (Muyzer, 1999).

Molekularne raziskave glivnih združb v lesu so pokazale vrsto zanimivih odkritij (Stenlid in sod., 2008):

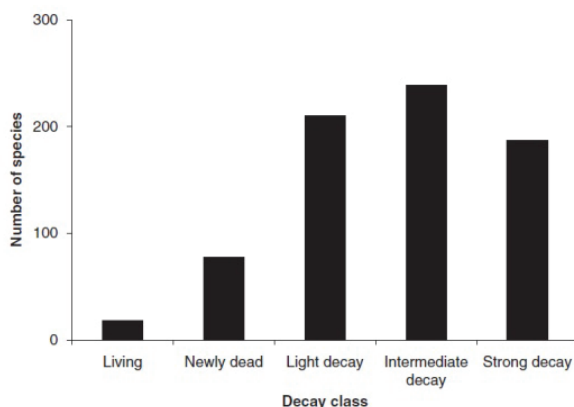
1. v lesu so z molekularnimi metodami pogosteje odkrili prisotnost gliv iz skupine Ascomycota kot s klasičnimi metodami,
2. v določenem habitatu je bilo prisotno veliko število vrst, za katere prej niso predvidevali, da so tam uspevajo,
3. odkrite so bile nove funkcije gliv, ki sodelujejo pri razgradnji lesa. Nekatere so poleg razgrajevalcev tudi mikorizne glive,
4. vrste, ki tvorijo konidije, so manj pogoste, kot bi lahko sklepali po klasičnih metodah.

Z razgradnjo lesa se zmanjšuje količina hranil oz. energije, ki je na voljo dekompozitorjem. Zato je število predstavnikov gliv iz debla Basidiomycota s trosišči na VLO v začetnih stopnjah razgradnje relativno majhno, največje je v srednjih stopnjah razgradnje, nato pa se njihovo število spet manjša (slika 1) (Stenlid in sod., 2008).

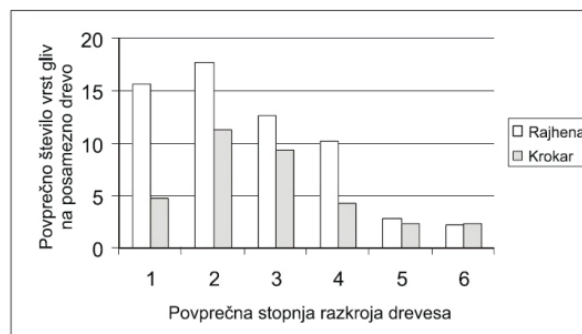
V Sloveniji so popise gliv na bukvi (*Fagus sylvatica* L.) v vseh stopnjah razgradnje opravili s klasičnimi metodami v okviru projekta NAT-MAN (Piltaver in sod., 2002).

Popis velja za prvi sistematični in poenoteni popis lignokolnih in prehransko drugih vrst gliv na VLO bukve v Sloveniji. Pred tem so že bili opravljeni popisi s strani S. Hočevar in sod. (1985 in 1995), vendar brez standardizirane metodologije ter vnaprej določenega števila preiskanih debel in opisa lastnosti le-teh (Grebenc in sod., 2009).

Frekvence vrst po stopnjah razkroja istega popisa so bile predstavljene v članku Razkroj lesa in biotska raznovrstnost gliv in bakterij v opadu naravnih sestojev z bukvijo (Grebenc in sod., 2009). Največje število vrst se je pojavljalo v zgodnejših fazah razkroja (1-3) (slika 2). Razporeditev števila vrst po stopnjah razkroja VLO bukve pa se v primerjalni analizi več evropskih držav bistveno ni razlikoval (Grebenc in sod., 2009).

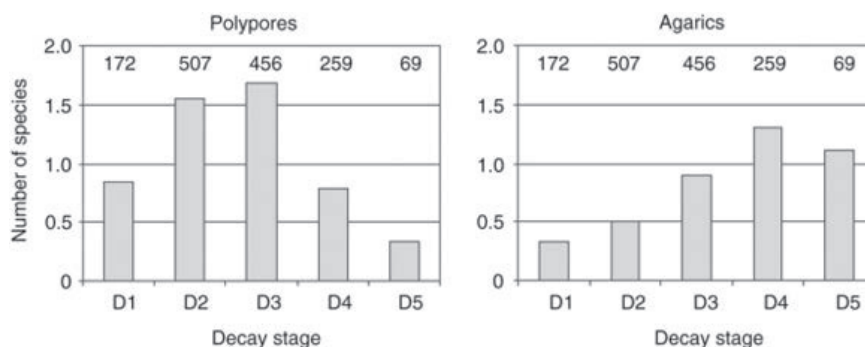


Slika 1: Število vrst glede na stopnjo razgradnje navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst) v borealnem gozdu (Stenlid in sod., 2008)



Slika 2: Vrstna pestrost gliv glede na razkrojno fazo lesnih ostankov navadne bukve (*Fagus sylvatica* L.) na ploskvah Rajhenavski Rog in Krokar (Grebenc in sod. 2009:49)

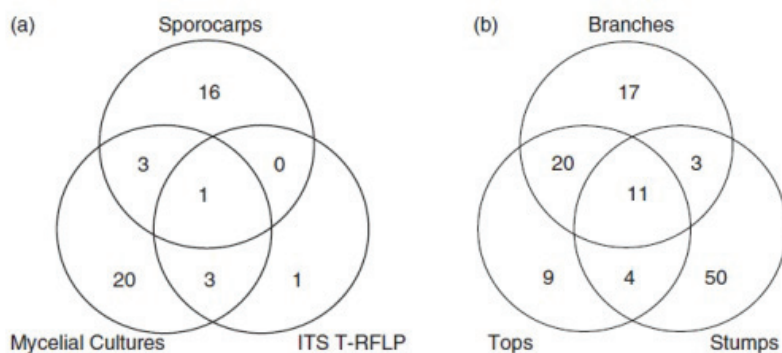
Sliki 1 in 2 nam pokažeta, da ni jasnega odgovora na to, ali se s stopnjo razgradnje pestrost gliv večja (slika 1) ali manjša (slika 2). Načeloma velja, da v stopnjah razkroja 3 in 4 začenjajo izginjati luknjičarke in se večja števila lističark (slika 3) (Stenlid in sod., 2008).



Slika 3: Povprečne vrednosti števila gliv luknjičark in lističark v različnih stopnjah razkroja CWD navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst) v borealnem gozdu (Stokland in Siitonen, 2012)

Sukcesijsko pot določene vrste gliv lahko predvidimo (Stokland in Siitonen, 2012), a vzorec združbe, ki ga zajamemo in obdelamo z določeno metodo, je podvržen pristranskosti izbrane metode. Tako z izbiro načina vzorčenja in metodologijo popisa pestrosti gliv bistveno vplivamo na končni rezultat pestrosti (slika 4) (Allmér in sod., 2006).

Molekularnih raziskav raznovrstnosti gliv na VLO v naravnih sestojih v Sloveniji še ni bilo.



Slika 4: Primerjava identifikacije glivnih vrst z metodo a) DNA identifikacija iz kultur micelija (Mycelial Cultures), identifikacija trosišč (Sporocarps), identifikacija preko ITS regije (ITS T-RFLP) in lokacijo b) na vejah (Branches), na vrhu drevesa (Tops) in na panjih (Stumps) (Allmér in sod., 2006:62).

3 CILJI NALOGE IN HIPOTEZE

Cilji diplomske naloge.

1. Razvijanje metodologije merjenja gostot VLO v vodnem mediju z namenom kasnejše standardizacije postopka, ki ni škodljiv za zdravje analitikov.
2. Ugotavljanje primerljivosti rezultatov merjenja gostot v vodnem in živosrebrnem mediju. V Sloveniji se je do uvedbe uredb EU pri raziskavah pomena VLO za dinamiko ogljika in biodiverziteto merila absolutna gostota določena z Breulovim živosrebrnim volumetrom (Kraigher in sod., 2002).
3. Razvoj in priprava protokola za delo s tehtnico Sartorius MSA 323S z dodatkom za merjenje gostote YDK01, ki je bila v Sloveniji prvič uporabljena za tovrstne meritve.
4. Ugotavljanje vpliva gliv na razkroj VLO.
5. Razvijanje analize DGGE za analize vzorcev VLO.
6. Ugotavljanje pestrosti in strukture združbe gliv pri različnih stopnjah razkroja VLO.

Pri tem smo postavili naslednje hipoteze.

1. Metoda merjenja gostot VLO v vodnem mediju na tehtnici Sartorius 323S je primerna za nadaljno uporabo.
2. Rezultati, izmerjeni v vodnem mediju, ne bodo primerljivi z rezultati, izmerjenimi v živosrebrnem.
3. Pestrost gliv se povečuje s stopnjo razkroja.
4. Struktura združbe gliv je odvisna od geografske lokacije vzorca VLO.
5. Združba gliv se spreminja z oddaljenostjo od zunanjega oboda do središča VLO.
6. Vrste gliv, ki uspevajo na velikih lesnih ostankih, so odvisne od stopnje razkroja.

4 MATERIAL IN METODE

4.1. RAJHENAVSKI ROG

Pragozdni rezervat Rajhenavski Rog je kot rezervat prvič omenil L. Hufnagl, leta 1904 (Bončina, 1999). Matična kamnina rezervata je apnenec, tla so rjava pokarbonatna in variirajo v globini zaradi pogostih vrtač. Prevladuje dinarski jelovo-bukov gozd (*Omphalodo-Fagetum*). Hektarska zaloga, tako mrtvega kot živega lesa, znaša 1072 m³ na hektar (Hartman, 1999).

Vzorci za raziskavo smo izvrtali/izžagali na južnem robu pragozdnega rezervata Rajhenavski rog na raziskovalni ploskvi, kjer so VLO raziskovali leta 2002 v okviru projekta NAT-MAN (Ódor in sod., 2006; Kraigher in sod., 2002).

4.2 DOLOČEVANJE STOPENJ RAZGRADNJE VLO

Popise stopenj razgradnje VLO smo izvedli po šeststopenjski lestvici v tričlanski sestavi (Domen Finžgar, Matej Rupel, dr. Miha Humar) (preglednica 2) (Kraigher in sod., 2002) v letih 2012 in 2013. 9. 7. 2013 je bila opravljena še revizija popisov, s katero smo določili končne vrednosti razgradnje. Vzorce za nadaljnje analize smo nabrali le znotraj prvih petih stopenj. Šesta stopnja ne omogoča meritev gostote ali izsekavanja VLO z motorno žago, saj je v tej stopnji celotno drevo že skoraj spremenjeno v prst.

Vizualni pregled popisa iz raziskave leta 2002 in te diplomske naloge je zbran v prilogi A.

Preglednica 2: Šeststopenjska lestvica faz razkroja (Kraigher in sod., 2002)

Faze razkroja	Skorja	Veje in poganjki	Trdota lesa	Površina	Oblika
1	Manjka največ 50 %	Prisotni	Trd, nož se zapiči največ 2 mm globoko	Prekrita s skorjo, površina nedotaknjena	krožna
2	Manjka več kot 50 %	Prisotne samo veje nad 3 cm	Trd, nož največ 1 cm globoko	Gladka, površina nedotaknjena	krožna
3	Manjka	Manjkajo	Postaja mehak, nož 1-5 cm globoko	Gladka ali razpokana, površina nedotaknjena	Krožna
4	Manjka	Manjkajo	Mehak, nož čez 5 cm globoko	Razpokana, manjši deli manjkajo, površina nedotaknjena	Krožna ali ovalna
5	Manjka	Manjkajo	Mehak, nož čez 5 cm globoko	Veliki deli manjkajo, površina spremenjena	Plosko ovalna
6	Manjka	Manjkajo	Mehak, samo ostanki lesa	Površina težko določljiva	Plosko ovalna, prekrita z zemljo

4.3 GOSTOTE VLO

Vzorci smo pridobivali z vrtanjem (vzorčenje in vrtanje sta izvedla Domen Finžgar in Matej Rupel) v velike lesne ostanke bukve (*Fagus sylvatica* L.) (ležeče in stoječe). Izbrani VLO so bili večinoma isti, kot v raziskavi leta 2002. Takrat so bili ustrezno označeni in opisani (Kraigher in sod., 2002). Dodatno je bil vključen en VLO izmed več na novo padlih VLO. Iz izvrtkov smo naključno izbrali 207 vzorcev za meritve gostot z živim srebrom in 163 vzorcev za meritve z vodo. Vzorce se je porazdelilo v stopnje razgradnje 1 do 5.

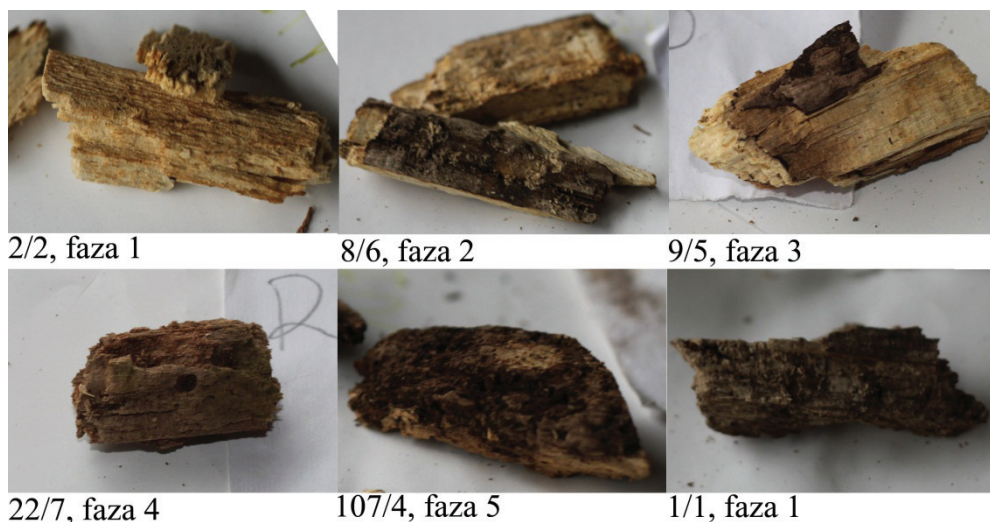
Za meritve z vodo smo vzorce odvzeli iz petindvajsetih različno velikih lesnih ostankov, za meritve z živim srebrom pa iz sedemnajstih. Merili smo absolutne gostote v živem srebru in osnovne gostote ter nasičene (nasičena masa vzorca na nasičen volumen vzorca) gostote v vodi.

Vzorci nepravilnih oblik velikosti od 0,8 cm³ – 15 cm³ (mediana = 4,2 cm³) so bili posušeni na 105±2 °C v štiriindvajsetih urah in nato ohlajeni na sobno temperaturo v eksikatorju. Kasneje so bili stehtani (natančnost tehtnice 0,0001) in potopljeni v živo

srebro. Za merjenje volumna smo uporabili Breuilev volumometer (natančnost $\pm 0,1 \text{ cm}^3$). Meritve je izvedel prof. dr. Miha Humar na Oddelku za lesarstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Isti vzorci niso bili primerni za meritve z vodo, ki jih je izvedel Domen Finžgar, saj se je v porah nabralo živo srebro, ki ga ni bilo mogoče odstraniti. Vzorci so bili zato ustrezno uničeni.

Za meritve z vodo smo izbrali nove vzorce iz istih izvrtkov, pri čemer velja poudariti, da je nehomogenost v razgradnji lesa znotraj istega izvrtanega materiala velika (slika 5). Izbrani vzorec je kar se da najbolje predstavljal povprečno stanje celotnega izvrtanega materiala.



Slika 5: Slika 1 Primeri vzorcev, na katerih so bile opravljene meritve gostot. Označeni so z ID oznako in fazo razkroja, ločeno z vejico (foto: Domen Finžgar, 2013)

Dobljene vzorce smo posušili na $105 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ v štiriindvajsetih urah in ohladili na sobno temperaturo v eksikatorju. Vzorcem smo izmerili maso, jih potopili v 50ml centrifugirke, napolnjene z MQ vodo, in jih prenesli v tlačno komoro (10 min – 200 mbar, 30 min – 9 bar, 10 min -200 mbar).

Vzorcem smo s krpico odstranili površinsko vodo in jim izmerili volumen ter gostoto na tehtnici Sartorius MSA 323S, z dodatkom za merjenje gostote YDK01 (slika 6). Pri opravljanju meritev smo se oprli na več raziskav, ki so že opisovale probleme merjenja

gostot v vodnem mediju (Vintila, 1939, Holz in Plickat, 1961, von Wedel, 1962, Ericson, 1966, Henrichs in Lassen, 1970, Olesen, 1971) in sledili navodilom zastopnika podjetja Sartorius v Sloveniji.



Slika 6: Tehnica Sartorius MSA 323S z dodatkom za merjenje gostot YDK01 (foto: Domen Finžgar, 2012)

Ker je bila tehtnica Sartorius MSA 323S v raziskavah Gozdarskega inštituta Slovenije uporabljena prvič, smo opravili še testno merjenje osmih testnih vzorcev lesa bukve z znanimi dimenzijami ($0,7 \times 1,0 \times 3,0$ cm).

Vzorci niso bili pobrani identično kot leta 2002, saj so bile uporabljene druge metode vrtanja, t.j. druge vrtnalne naprave in svedri manjših premerov. Posledica so bili manjši vzorci kot pri predhodni raziskavi, opravljeni leta 2002. Prav tako je bilo uporabnih vzorcev manj. Vzorcev ni bilo mogoče nažagati na idealno dimenzijo $3 \times 2 \times 2$ cm velikih kvadrov (Kraigher in sod., 2002).

Pri meritvah z vodno tehtnico se relativna masa vzorca v vodi stalno nekoliko spreminja, tako da prihaja do manjših odstopanj od začetno zabeležene mase. Programsko okolje tehtnice samo poskrbi za preračunavanje gostote po formuli:

$$\rho = \frac{W(a) * \rho(fl)}{W(a) - W(fl)}, \quad \dots(2)$$

$W(a)$ = masa v zraku, $W(fl)$ = relativna masa v vodi, $\rho(fl)$ = gostota vode

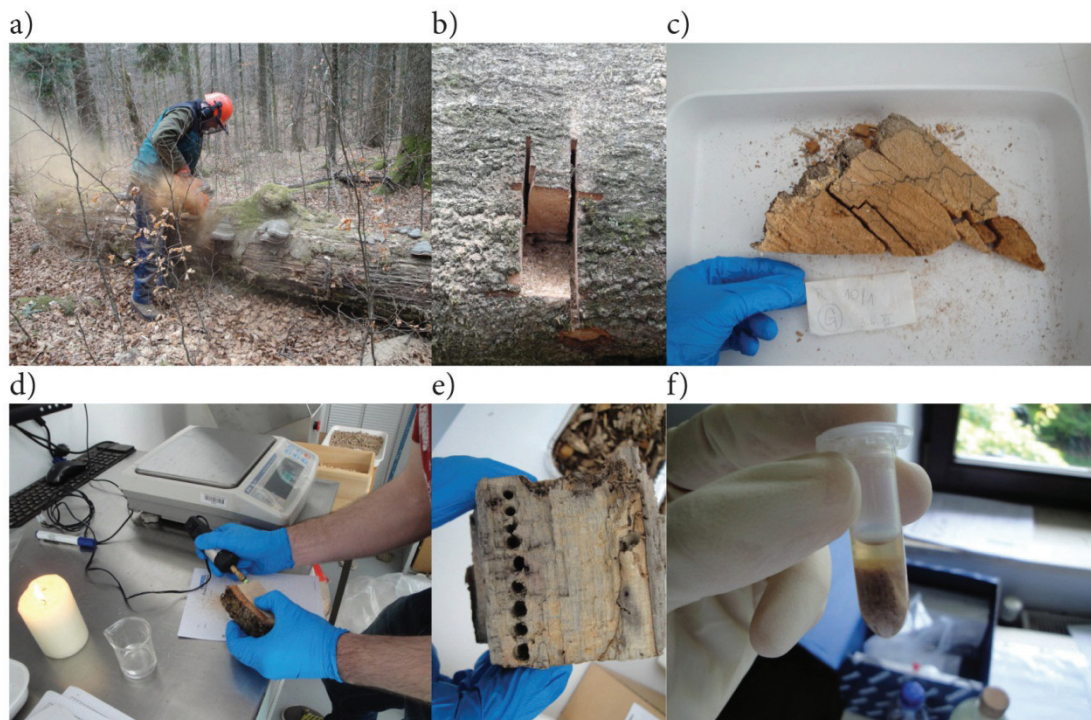
Zato pride do malenkostnih razlik med merjeno in izračunano nasičeno in osnovno gostoto.

4.3.1 Statistična obdelava rezultatov meritve gostot

Dobljene rezultate smo statistično obdelali v programskih okoljih Microsoft Excel 2003 in IBM SPSS statistics 19. Za test neodvisnosti vzorcev nismo mogli uporabiti ANOVE, saj se vrednosti gostot niso porazdeljevale po naravni porazdelitvi. Tako smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test, ki te porazdelitve ne predvideva. Z njim smo testirali ničelno hipotezo, da vzorci različnih stopenj razkroja pripadajo identični stopnji razkroja. Za test neodvisnosti faz 3 in 4 smo iz enakih razlogov namesto Studentovega T testa izbrali Mann-Whitneyev U test. Upoštevali smo stopnjo zaupanja 0,95. Ker se pri obeh testih namesto povprečne vrednosti upošteva mediano, so rezultati meritev gostot prikazani v boxplot diagramih z mediano.

Glede na našo ničelno hipotezo in stopnjo zaupanja lahko upoštevamo, da, kadar je P vrednost pod 0,05, obstajajo razlike med petimi fazami razkroja.

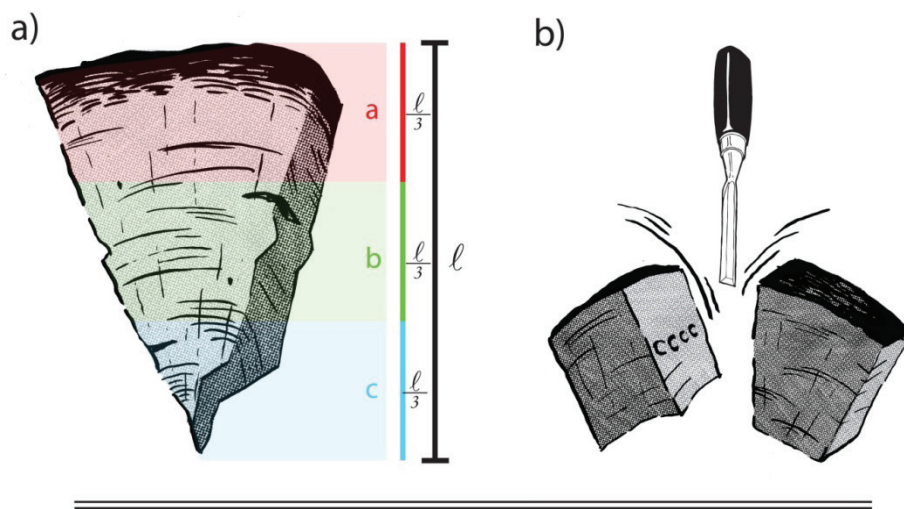
4.4 SUKCESIJA IN DIVERZITETA GLIV V RAZGRAJUJOČIH SE VLO



Slika 7: Potek dela na ugotavljanju sukcesije gliv v VLO: od vzorčenja na terenu (a, b), do tehtanja pit in ugotavljanja globinskih profilov vzorcev (c), vrtanja v globinske profile (d,e) in nenazadnje do ekstrakcije glivne DNA (f) (foto: Domen Finžgar, 2012-2013)

Vzorci, trikotne lesene pite, so bili izžagani z motorno žago (izžagovanje je opravil Robert Kranjec) na izbranih VLO. Vzorčili smo skupno 28 VLO (po najmanj pet na določeno stopnjo razgradnje), na vsakem smo izžagali najmanj tri pite, skupno 86 pit. Vedno smo vzorčili na zahodnih ali severnih delih VLO. Vzorce se je preneslo v Laboratorij za lesno biomaso na Gozdarskem inštitutu Slovenije.

Vsem pitam je bila izmerjena masa pred in po sušenju. Sušili smo jih na 25 ± 2 °C, 10-15 dni. Ponekod se je na spodnji strani pite razvila plesen. Vsako pito smo nato z dletom, ki je bilo ob vsakem vzorcu razkuženo z alkoholom in plamenom, razklali na tri globinske profile: A, B in C (slika 8, a). Izbran globinski profil je bil nato ponovno razklan na polovico, da smo pridobili čisto površino za vrtanje (slika 8, b).



Slika 8: Način pridobivanja »tretjinskih« globinskih profilov (a), sekanje globinskega profila na polovico, z namenom pridobivanja »nedotaknjene« površine za vrtnanje (b) (Ilustracija: Domen Finžgar, 2013)

Zaradi različnih stopenj razkrojenosti lesa ponekod ni bilo možno dobiti vseh globinskih profilov. Predvsem je manjkal profil C, ki ga je bilo težje pridobiti v stopnjah razkroja 4 in 5.

Sledilo je vrtnanje (slika 7, d) z razkuženim svedrom po sredini »nedotaknjene« površine razklanega profila. Pridobljen prah, izhodišče za DNA ekstrakcijo, je bil spravljen v papirnate žepke in primerno označen s šifro drevesa, šifro pite in šifro globinskega profila (npr. 201/3/A pomeni tretja pita VLO 201, globinski profil A).

Za potrebe ekstrakcije DNA smo vzorčili/izvrtali skupno 138 vzorcev iz 22 različnih dreves, v tej številki pa so zajete vse pite vsaj treh dreves na posamezno stopnjo razgradnje. Vizualni pregled 22 izbranih dreves je predstavljen v prilogi B, preglednica 136 vzorcev, ki so bili uspešno analizirani z DGGE pa v prilogi C.

Zaradi želje po čim večji sterilnosti okolja smo z vzorci, od prenosa v laboratorij, rokovali v rokavicah, vsa orodja redno razkuževali in vzorce shranjevali v PVC vrečke.

Laboratorijsko delo se je nato preselilo v prostore Laboratorija za gozdno genetiko, od poletja 2012 do poletja 2013. V njem so meritve opravljali Domen Finžgar, Marko Bajc, ter v uvajalnem delu tudi Barbara Štupar. Izvrtan prah smo v 50mg količinah prenesli v

2,0-mililitrske centrifugirke (slika 7, f) in izvedli postopek ekstrakcije DNA. Pri tem smo uporabljali komplet za ekstrakcijo DNA Dneasy mini kit proizvajalca Qiagen (Dneasy Plant Handbook, 2012). Upoštevali smo navodila proizvajalca z manjšimi modifikacijami. Ker suh lesni prah vpije velike količine tekočine, smo v začetnih fazah uporabili trikratne volumne pufra AP1, RNaze in pufra P3, da smo zagotovili zadosten volumen ekstrakcijske mešanice za nadaljnje korake. Komplet ekstrahira poleg glivne tudi rastlinsko DNA, kar predstavlja problem pri določevanju deleža glivne DNA.

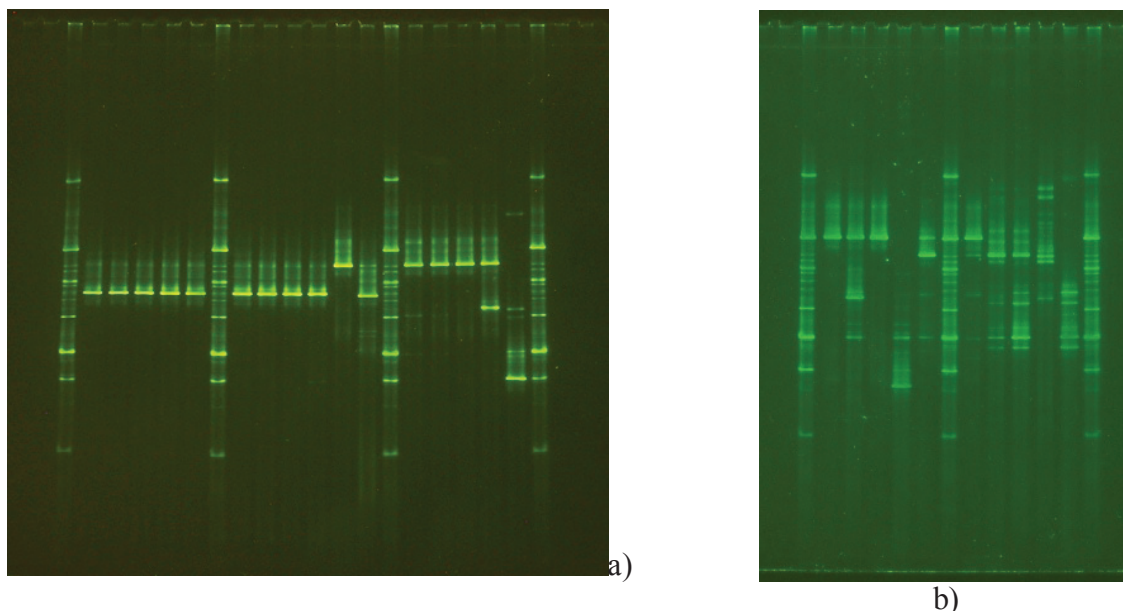
Pridobljeno DNA smo zamrznili do njenega pomnoževanja. S PCR in začetnima oligonukleotidoma ITS1F-GC (Gardes in Bruns, 1993) in ITS2 (White in sod., 1990) smo pomnožili regijo ITS1 glivnega ribosomskega operona. Pripravili smo 25-mikrolitrске reakcije, ki so vsebovale 1-kratno koncentracijo AmpliTaq Gold pufra, 2,5 mM MgCl₂, 200 μM vsakega od štirih dNTP, 0,32 μM vsakega začetnega oligonukleotida in po 1 enoto DNA polimeraze AmpliTaq Gold (Applied biosystems). Uspeh vsakega pomnoževanja smo preverili na agaroznem gelu (1,5 % (m/v) agaroze, 0,5× pufer TBE). Zaradi specifičnosti vzorčnega materiala je bilo PCR postopek potrebno večkrat testirati in prilagajati. Prilagajati je bilo potrebno izključno količino DNA, ki smo jo dodali v PCR. Pri nekaterih vzorcih so se pri različnih redčitvah pojavljali pasovi različnih dolžin, ali pa PCR produktov sploh ni bilo, kar je najverjetneje rezultat prisotnosti sekundarnih metabolitov, ki učinkujejo kot inhibitorji PCR, in jih skozi postopek ekstrakcije DNA nismo uspeli odstraniti (Thaler in Bajc, 2013) ter majhnih količin tarčne DNA. Največ vzorcev se je uspešno pomnoževalo pri 5-kratni redčitvi DNA.

Po zagotovitvi uspešnosti vsakega vzorca v procesu njegovega pomnoževanja smo produkte PCR preučili z metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturantov (DGGE). Gre za analitsko tehniko, kjer zaradi različne elektroforetske mobilnosti fragmentov DNA, poteka ločba pridobljenih PCR produktov na različnih delih v gelu. Ločba je potekala pri naslednjih pogojih: 8 % raztopina (m/v) akrilamid:bis-akrilamid (37,5:1), pufer 1× TAE, gradient denaturantov 20 %-60 %, temperatura 60 °C, napetost 71 V, čas 17 h.

Na vsak gel je bil poleg PCR produktov dodan še standard (20 μ l). Ta je zmes več vzorcev PCR, ki so se v DGGE gelu združeno ločili po karseda širokem razponu gradienta. To omogoča kasnejšo normalizacijo rezultatov in posledično primerjavo različnih gelov.

Tudi pri tehniki DGGE je bilo potrebno prilagajati količine PCR, ki smo jih nanašali na DGGE gele, zaradi različne kvantitativne uspešnosti PCR tehnike. Za uspešno delovanje DGGE je bilo potrebno dodajati od 2 do 20 μ l produktov PCR.

Gel z različnimi pasovi (angl. »bands«) je končni rezultat te analitske tehnike in našega dela v laboratoriju, pri čemer skupek vseh pasov v enem vzorcu imenujemo DGGE profil (slika 9). Vsak edinstven pas teoretično predstavlja PCR produkt s svojevrstnim nukleotidnim zaporedjem, ki se razlikuje od drugih edinstvenih pasov. Vsak svojevrsten pas tako predstavlja drugo vrsto ali sev glive. Obratno velja, da pasovi, ki se v DGGE gelu ustavijo na isti poziciji, predstavljajo identično nukleotidno zaporedje oz. enako vrsto ali sev glive.



Slika 9: Rezultat DGGE je gel, ki prikazuje različno ločene pasove. Vsak stolpec v gelu predstavlja določen vzorec (npr. 201/3/A). Na sliki so jasno vidni tudi enako pestri stolpci v enakih razmakih od prvega stolpca dalje. To so standardi, ki omogočajo normalizacijo različnih gelov. Na sliki vidimo manj pester gel, druge stopnje razgradnje (a) in bolj pester gel v peti stopnji razgradnje (b).

4.4.1 Statistična obdelava rezultatov DGGE

Posamezne gele smo obdelali v programu BioNumerics (Opravila Marko Bajc in Domen Finžgar) (BioNumerics verzija 6.1, produkt podjetja Applied Maths NV., dostopen na <http://www.applied-maths.com>). V njem smo ustvarili bazo podatkov, kjer smo na podlagi standardov normalizirali vse gele in s funkcijo ujemanja pasov (ang. »band matching«) poiskali vse pasove. Pri tem smo uporabili toleranco 0,25 % in minimalno površino pasov 3 %.

BioNumerics nam sam pove podatek o številu različnih pasov in njihovi intenziteti. Tako lahko operiramo z binarnimi podatki (1-sev/vrsta je v vzorcu prisotna, 0-sev/vrsta v vzorcu ni prisotna) ali z intenzitetami podanimi v procentih. Ker so podatki o intenzitetah uporabni le, če poznamo dejansko količino glivne DNA v ekstraktih DNA, smo nadaljnje analize opravljali le z binarnimi podatki.

Podatke smo statistično (Vse nadaljnje statistične postopke je izvajal Domen Finžgar, z nasveti Marka Bajca) uredili v programskem okolju Microsoft Excel. Razvrščanje v skupine (ang. »cluster analysis«) smo opravili v programskem okolju IBM SPSS Statistics 19. Vzorce smo razvrstili v skupine na podlagi Diceovih koeficientov. (DQ) (Dice, 1945). Koeficienti omogočajo enostavno merjenje podobnosti med dvema vzorcema po formuli:

$$DQ = \frac{2C}{A+B}; \quad \dots(3)$$

A = število pasov v vzorcu 1; B = število pasov v vzorcu 2; C = število pasov, ki so prisotni v obeh vzorcih

Za test neodvisnosti stopenj razgradnje glede na pestrost glivnih združb ugotovljenih iz DGGE profilov smo uporabili Kruskal Wallisov test. Uporabili smo tudi analizo molekulske variance AMOVA (Excoffier in sod., 1992), ki smo jo na osnovi matrike razdalj izračunanih iz primerjave DGGE profilov, izvedli v programu Arlequin 3.5 (Excoffier in sod., 2005).

Na podlagi Diceovih koeficientov (DQ) smo izračunali Bray Curtisove (BC) razdalje po formuli:

$$BC=1-DQ \quad \dots(4)$$

Da bi ugotovili odvisnost geografskih razdalj med posameznimi VLO (relativne vrednosti v enoti pt) z genetskimi (Bray-Curtis), smo opravili več neodvisnih testov. V tem procesu smo izločili vse VLO z manj kot petimi vzorci na VLO in kot osnovni vzorec vzeli združen DGGE profil celotne pite. Montmonierjev test genetskih barier (Montmonier, 1973) smo izvedli v programu Barrier v2.2 (Manni in sod., 2004), z Mantelovim testom korelacije dveh matrik (Mantel, 1967) smo testirali ničelno hipotezo H_0 : Matriki genetske in geografske razdalje nista v korelaciji. Test smo izvedli s programom PASSaGE 2 (Rosenberg in sod., 2011). Pognali smo še test SAMOVA (Dupanloup in sod., 2004), ki temelji na AMOVI, le da analizo molekulske variance obravnava na podlagi matrike geografskih razdalj. Z Montmonierjevim testom razdeljeni 2 skupini VLO smo znova testirali z AMOVO.

Pri vseh analizah smo uporabili $\alpha=0,05$.

5 REZULTATI Z RAZPRAVO

5.1 GOSTOTE VLO

Rezultati tega dela raziskave so gostote, izmerjene tako z živosrebrnim kot tudi z vodnim volumetrom.

Preglednica 3 prikazuje rezultate meritev testnih vzorcev v vodnem mediju. Razlike med volumnoma so pričakovane, saj izračunan volumen ne predvideva konkavnosti vzorcev, ki je možna. Z minimalnimi razlikami v volumnih smo ocenili, da je tehtnica Sartorius MSA 323S primerna za nadaljnje meritve.

Preglednica 3: Razlike volumnov merjenih s Sartorius MSA 323S (merjen volumen (H₂O) in izračunanih volumnov, osemih testnih vzorcev)

ID vzorca	Masa [g]	izračunan volumen [cm ³]	merjen volumen (H ₂ O)[cm ³]	razlika v procentih
1	2,687	5,512	5,452	1,10
2	2,9069	5,596	5,450	2,69
3	2,9783	5,621	5,515	1,92
4	3,0915	5,527	5,403	2,30
5	2,9684	5,556	5,433	2,27
6	3,1965	5,580	5,444	2,50
7	2,7725	5,418	5,223	3,73
8	2,8079	5,502	5,415	1,61
				2,26
				povprečje

Povprečne vrednosti različnih gostot so predstavljene v preglednici 4. Vrednosti meritev so primerljivega velikostnega razreda kot tiste iz leta 2002 (Kraigher in sod., 2012), standardni odklon pa je višji. Velja preučiti možnosti ustrežnejšega odvzema vzorcev in njihovega prevoza na merilno mesto.

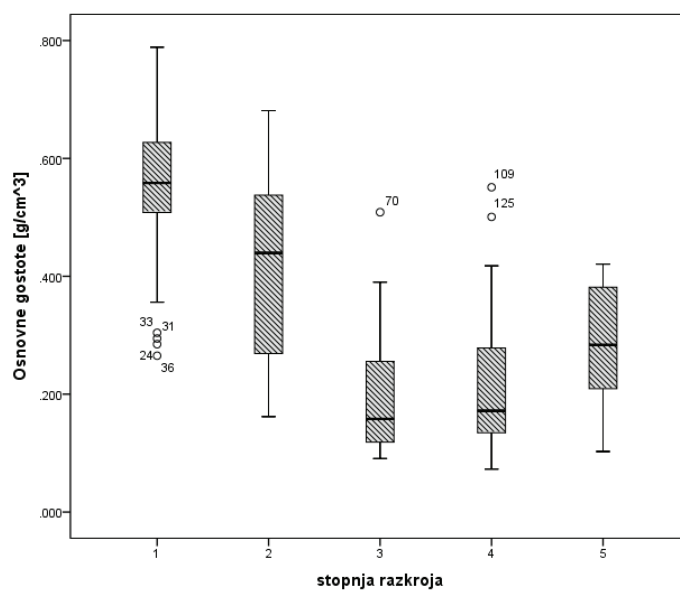
Iz rezultatov smo izključili meritve vzorcev prve in druge stopnje razgradnje v živosrebrnem mediju zaradi suma, da so jim bile stopnje pred revizijo 9. 7. 2013 napačno ocenjene (preglednica 4).

Preglednica 4: Povprečne vrednosti in standardni odklon (SD) različnih gostot po fazah razkroja.

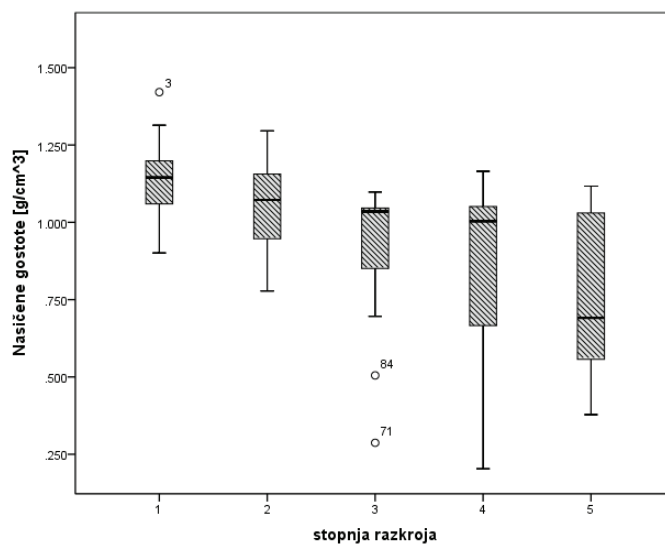
Faza razkroja/število vzorcev	Povprečne vrednosti različnih gostot [g/cm ³]					
	Osnovna gostota (H ₂ O)	SD osnovne gostote	Nasičena gostota (H ₂ O)	SD nasičene gostote	Absolutna gostota (Hg)	SD absolutne gostote
1 O (39), N (40), A (0)	0,552016	0,129337	1,1305	0,109236		
2 O(30), N (30), A (0)	0,41571	0,14907	1,0543	0,128787		
3 O(21), N (20), A (38)	0,201396	0,084346	0,90935	0,216978	0,262	0,116
4 O(46), N (48), A (96)	0,20889	0,114391	0,83275	0,281783	0,250	0,120
5 O(27), N (27), A (54)	0,281756	0,103408	0,780259	0,254955	0,322	0,136

Mediana odstopanja med izmerjeno in izračunano nasičeno gostoto je znašala 0.0012 g/cm³, maksimalno odstopanje pa je znašalo 0.7456 g/cm³, pri čemer predvidevamo, da gre za napako merilca. Naslednja maksimalna vrednost namreč znaša 0.0023 g/cm³. Odstopanja pri osnovnih gostotah so podobnega velikostnega razreda. Napake zaradi odstopanja izmerjene in izračunane vrednosti pri nasičenih in osnovnih gostotah so zanemarljive.

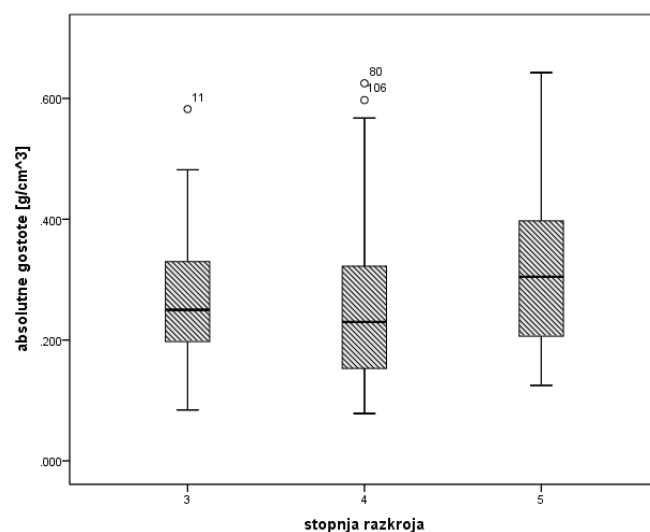
Gostota lesa s stopnjo razkroja pada (Stokland in Siitonen, 2012), kar rezultati, pridobljeni v tej raziskavi, potrjujejo (preglednica 4, sliki 10 in 11), razen pri stopnji pet, ki je nenavadno visoka. Nasičenih gostot doslej v znanstvenih razpravah o VLO nismo zasledili in je zato razprava o njihovi uporabi težavna, čeravno je za merjenje na naši tehtnici Sartorius ta gostota najenostavnejša. Stopnji faz razkroja 3 in 4 sta si bili tako v absolutni gostoti, kot tudi v osnovni gostoti, podobni (preglednica 5), kar je najverjetneje problem uvrščanja posameznega VLO v določeno stopnjo razgradnje in načina vzorčenja.



Slika 10: Diagram box plot, ki prikazuje vrednosti osnovnih gostot, merjenih v vodi, po fazah razkroja



Slika 11: Diagram box plot, ki prikazuje vrednosti nasičenih gostot, merjenih v vodi, po fazah razkroja



Slika 12: Diagram box plot, ki prikazuje vrednosti absolutnih gostot, merjenih v živem srebru, po fazah razkroja

Preglednica 5: P (sig.) vrednosti Kruskal-wallis in Mann-Whitney U testov

	Kruskal-Wallis vseh treh faz					
	Absolutne gostote (Hg)		Nasičene gostote (H2O)		Osnovne gostote (H2O)	
P value.	0,005		0,000		0,000	
	Mann-Whitney U test faz 3 in 4					
	Absolutne gostote (Hg)		Nasičene gostote (H2O)		Osnovne gostote (H2O)	
P value.	0,244		0,557		0,746	

Uvrščanje VLO po stopnjah razgradnje je podvrženo subjektivni oceni, hkrati pa je nehomogenost vzorčnega materiala znotraj iste stopnje razgradnje velika (slika 5). Zato velja premisliti o načinu vzorčenja. Namesto naključnega, bi po oceni stopnje razgradnje lahko raje uporabili usmerjeno vzorčenje. Izbrali bi torej vzorec, ki kar najbolje predstavlja stopnjo, ki smo jo pred tem določili. Zaradi boljše odločitve bi to moralo biti opravljeno že na terenu! Določitev najustreznejše stopnje razkroja določenega VLO je zahteven proces, ki se ga raziskovalci lotijo zelo različno. Obstajajo 4, 5, 6 in celo 8 stopenjske lestvice razkroja, z različnimi načini določanja, dostikrat se pri analizah stopnje združuje (Fraver in

sod., 2002; Stokland in Siitonen, 2012). Na veliko razpršenost rezultatov meritev gostote v višjih fazah razkroja pa lahko poleg ocene faze razkroja na terenu, načina vzorčenja, velikosti in razpadanja vzorca, možne prisotnosti zračnih mehurčkov, vpliva tudi neenakomeren potek razgradnje in posledično velika nehomogenost analiziranih vzorcev.

Velikost vzorca vpliva na natančnost meritev, omejen pa je tako z lastnostmi merilnih naprav, kot tudi z velikostjo posegov v pragozdnih rezervatih. Znano je, da natančnost meritev pada z manjšanjem volumnov in večanjem neravnih površin (Ericson, 1966; Olesen, 1971), hkrati pa se zmanjšuje variiranje rezultatov (Fraver in sod., 2002; Olesen, 1971). Bilo bi torej smotrnejše meriti ravno izžagane vzorce večjega velikostnega razreda (6 cm^3 ali večje). Ravno izžagani vzorci so možni samo pri VLO začetnih faz razkroja, njihova pridobitev pa povzroča večje poškodbe na drevesih v pragozdnih rezervatih (Teodosiu in Bouriaud, 2012). Prav tako je velikostni razred vzorca omejen z dimenzijami tehtnice Sartorius. Ta ne dovoljuje meritev vzorcev, večjih od cca $15\text{--}25\text{ cm}^3$ (odvisno od oblike vzorca), še bolj pa je omejujoče določanje gostote z živim srebrom, kjer je volumen omejen na 6 cm^3 .

Kakršnekoli statistične primerjave meritev z živim srebrom in tistih, opravljenih z vodo, niso ustrezne, saj so bile merjene različne gostote (Wagenfuhr, 1966).

Merjenje absolutnih gostot razkrojenega lesa v vodnem mediju ni bilo mogoče. Možna bi bila prilagoditev tehtnice za merjenje absolutnih gostot v petroleju (Vintila, 1939), vendar programsko tega tehtnica ne predvideva, poleg tega je metoda prezamudna in je v našem pregledu literature nismo zasledili.

Pri spoznavanju tehtnice Sartorius MSA 323S in dodatka YDK01 smo odkrili nekaj fenomenov, ki vplivajo na rezultate. Pri višjih fazah razkroja vzorcev lesa lahko med nasičenjem v vodi in prenašanjem na merilno napravo povzročimo razpad vzorcev ali deformacijo njihovega volumna. Zato moramo med merjenjem z njimi ravnati skrajno previdno, poskrbeti je potrebno za odstranitev odvečne vode s površine vzorca. Med merjenjem z YDK01 pogosto nastajajo zračni mehurčki, ki jih moramo sproti predreti, saj nepredrti močno vplivajo na rezultate.

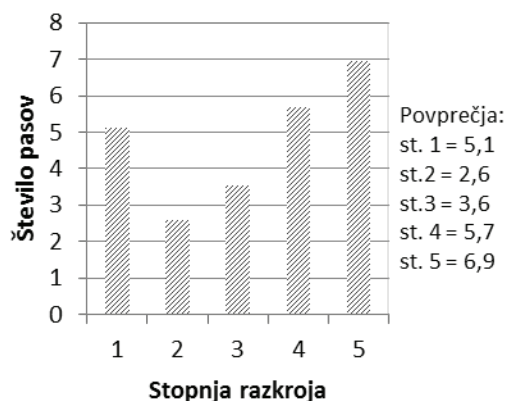
5.2 SUKCESIJA IN DIVERZITETA GLIV V RAZGRAJUJOČIH SE VLO

5.2.1 Pregled rezultatov DGGE

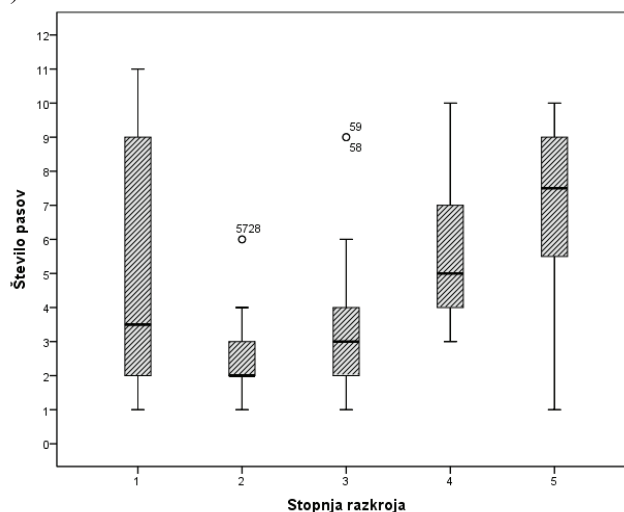
Slikovni rezultati DGGE analize so zbrani v prilogi D, tabelirani rezultati pa v prilogi C.

Na skupno 136 vzorcih smo z analizo DGGE našli 116 različnih pasov (domnevnih sevov/vrst gliv). Nekateri so se pojavljali posamič, drugi so bili prisotni v več vzorcih. Najbolj pogost je bil pas z oznako »41,8 %« (njegova relativna pozicija v gelu), slednji se je pojavil v kar 37,5 % vseh vzorcev.

a)



b)



Slika 13: Povprečno število pasov na stopnjo razgradnje posameznega vzorca (a). Diagram boxplot števila pasov po stopnjah razkroja posameznega vzorca (b)

Slika 13 prikazuje kako pestrost glivne združbe s stopnjo razkroja narašča. Slednje ni presenečenje (slika 1), čeprav podobna raziskava opravljena na istem območju (Grebenc in sod., 2009) kaže drugačno pestrost (slika 2). Glavna razlika med to in prejšnjo raziskavo je predvsem v metodologiji ocenjevanja pestrosti. Ker je šlo v raziskavi iz leta 2009 za klasično metodologijo, rezultati niso primerljivi z našimi. Razkorak med povprečnim številom gliv na vzorec na posamezno stopnjo razgradnje, ugotovljenim v tej raziskavi in

raziskavi Grebenc in sod. (2009) je posledica dejstva, da je bila količina vzorca odvzetega v naši raziskavi v primerjavi s celotnim VLO izredno majhna in posledično ni mogla zaobjeti vseh gliv v posameznem VLO. Ravno tako je v naši raziskavi vzorec predstavljal prah izvrtan iz enega globinskega profila ene pite, v nasprotju z raziskavo Grebenc in sod. (2009), kjer vzorec predstavlja cel VLO. Pričakovana pristranskosti iz preglednice 1 (Schmit in Lodge, 2005) drži tudi za to raziskavo. Poleg tega smo v analizi zanemarili vse pasove, ki so predstavljali manj kot 3 % skupne informacije v vsakem vzorcu nanesenem na DGGE. Dodaten dejavnik pri manjši ugotovljeni pestrosti predstavlja dejstvo, da smo zaradi občutljivosti metode PCR-DGGE v izogib zaznavi gliv, ki niso vključene v razgradnjo VLO (npr. zračno prenosljive spore ubikvitarnih gliv), iz analize izključili površino debel.

Zanimivo je odstopanje prve stopnje razkroja od splošnega trenda. Njena visoka pestrost je lahko posledica več dejavnikov. Ker so bili produkti PCR, opaženi na agaroznem gelu, šibki, to nakazuje manjšo dejansko količino DNA v teh vzorcih. Zato smo pri nanašanju produktov PCR na DGGE gel uporabljali večje volumne vzorcev PCR. Vzorci prve stopnje razgradnje, pri katerih smo zaznali visoko pestrost, so bili tudi tisti, ki so dajali majhne količine produktov PCR. Te vzorce smo nanašali na gel v 14-20 μ l in so v prilogi D označeni z rdečo puščico. Vizualni pregled teh vzorcev nakazuje, da so le-ti v primeru prve stopnje razgradnje nesorazmerno veliko prinesli k celokupni pestrosti, česar pri tovrstnih vzorcih četrte stopnje razgradnje ni opaziti. V primeru omenjenih vzorcev prve stopnje razgradnje je možno, da del pasov, ki smo jih pomnožili s PCR in zaznali z DGGE pripada glivam, ki nimajo aktivne vloge pri dekompoziciji VLO. Kljub odvzemu vzorca za ekstrakcijo DNA, ki je bil izveden tako, da smo karseda zmanjšali možnost prenosa glivnega materiala s strani površine debela na površino, iz katere smo izvrtali material za ekstrakcijo DNA, možnosti prenosa glivnih kontaminant v sledovih ni mogoče povsem izključiti. V primeru vzorcev, ki so rutinsko dajali primerne količine produktov PCR (posledica zadostnih količin tarčne DNA), tovrstne kontaminante ostanejo pod mejo detekcije uporabljene metode PCR-DGGE. Nasprotno pa pri vzorcih, kjer je tudi tarčna glivna DNA prisotna v zelo majhnih količinah, lahko zaznamo tudi kontaminante v sledovih, kar neposredno vpliva na informacijo o pestrosti in identiteti gliv v vzorcih VLO.

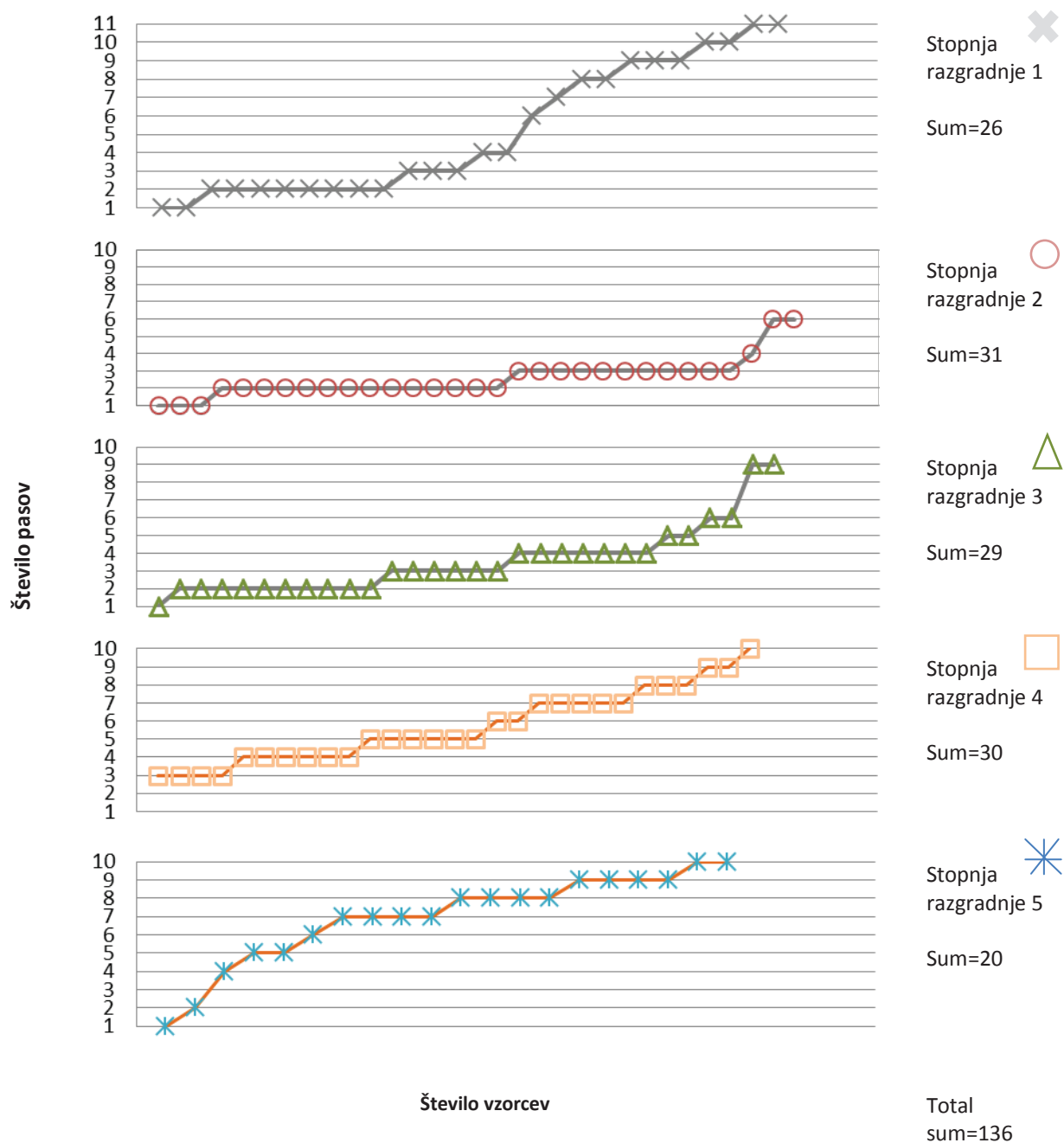
Pestrost v prvi stopnji je lahko tudi posledica dejstva, da le redka drevesa v naravnih sestojih padejo na tla brez glivnih okužb. Ko pa so v stiku s tlemi, nastopi močna kompeticija s tam prisotnimi glivami in pestrost se lahko pred vzpostavitvijo ravnotežja zveča (Boddy, 2001).

Slika 14 prikazuje porazdelitev pestrosti vzorcev v posameznih stopnjah razgradnje, ki so jo prikazovali geli DGGE. Iz nje in iz slike 13b lahko razberemo tudi to, da mediana verjetno predstavlja realnejše stanje pestrosti v posamezni stopnji razkroja, saj se v 1. stopnji razkroja skoraj polovica vzorcev nahaja pod mejo treh pasov na vzorec, medtem ko se pri navidez podobni pestrosti v stopnji razkroja 4, pri treh pasovih na vzorec, štetje pestrosti šele začne.

Rezultati Kruskal-Wallisovega testa so pokazali, da obstajajo statistično signifikantne razlike v iz DGGE profilov ugotovljenem številu gliv med stopnjami razkroja ($P = 0,000$).

Rezultati AMOVE razdelijo delež variance med stopnjami razkroja na 11.32% in delež variance znotraj stopnje razkroja na 88.68 %. Tudi AMOVA pokaže signifikantne razlike med stopnjami ($P=0,000$). Tu velja poudariti, da je vrednost P izračunana iz vrednosti F_{st} , ki v zadnjem času v literaturi ne veljajo več za univerzalno ustrezen kazalec diferenciacije med izbranimi skupinami (Hedrick, 2005; Merimans, 2006; Jost, 2008; Meirmans, Hedrick 2011).

Vseeno je zaželeno, da se F_{st} vrednosti v rezultatih prikazujejo zaradi primerjav s starejšimi študijami, ki so uporabljale izključno ta kazalec diferenciacije (Mermans 2011, Hedrick 2011). F_{st} vrednosti med stopnjami razgradnje (1-5) so prikazane v preglednici 6. Večja F_{st} vrednost pomeni večjo diferenciacijo med stopnjama razkroja (Excoffier in sod., 1992).

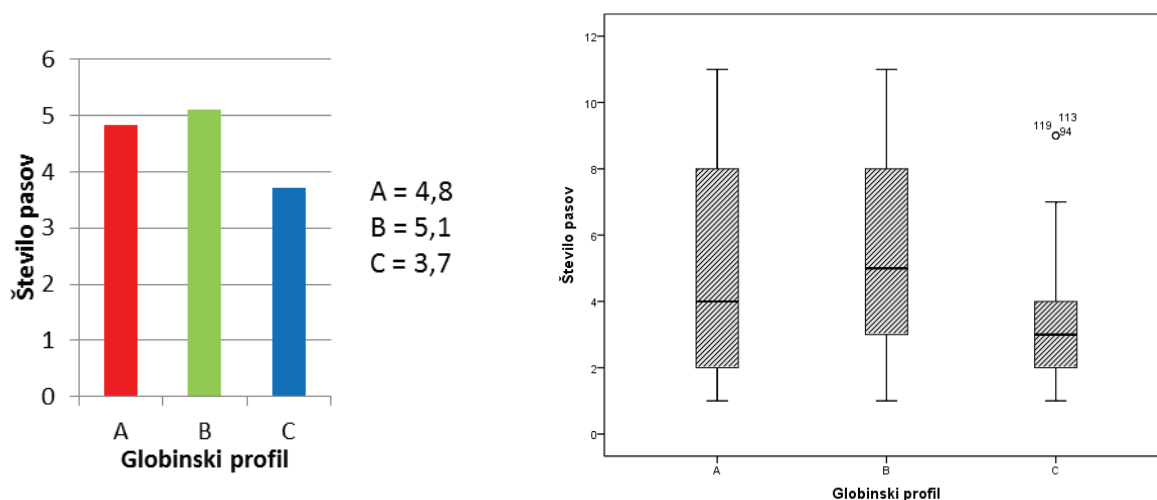


Slika 14: Porazdelitev števila pasov na odvzetem vzorcu, glede na stopnjo razkroja

Preglednica 6: F_{st} vrednosti med posameznimi stopnjami razgradnje

	1	2	3	4	5
1	0.00000				
2	0.14410	0.00000			
3	0.08793	0.07946	0.00000		
4	0.06868	0.16883	0.10166	0.00000	
5	0.11167	0.18478	0.15088	0.06046	0.00000

Pri primerjavi števila pasov glede na globinski profil je bila ugotovljena bistveno manjša razlika med skupinami (slika 15). Tudi Kruskal-Wallisov test ne predvideva razlik med postavljenimi skupinami ($P = 0.100$), prav tako tudi test AMOVA z majhnimi F_{st} vrednostmi (preglednica 7). Morebiti bi se pokazale večje razlike, če bi namesto skupnih globinskih DGGE profilov primerjali dejansko vrstno sestavo združb po globinskih profilih (Boddy, 2011), ki bi jo lahko ugotovili iz nukleotidnih zaporedij pasov v DGGE profilih. Na naše rezultate analize združbe po globinskih profilih so morebiti vplivali tudi drugi dejavniki, npr. stopnja razgradnje, katerih vpliv bi sicer lahko zmanjšali, če bi primerjali globinske profile po posameznih pitah ali VLO, vendar bi s tem analizo omejili na zelo majhno število vzorcev.



Slika 15: Povprečje števila pasov glede na globinski profil (a), boxplot diagram števila pasov po globinskem profilu (b)

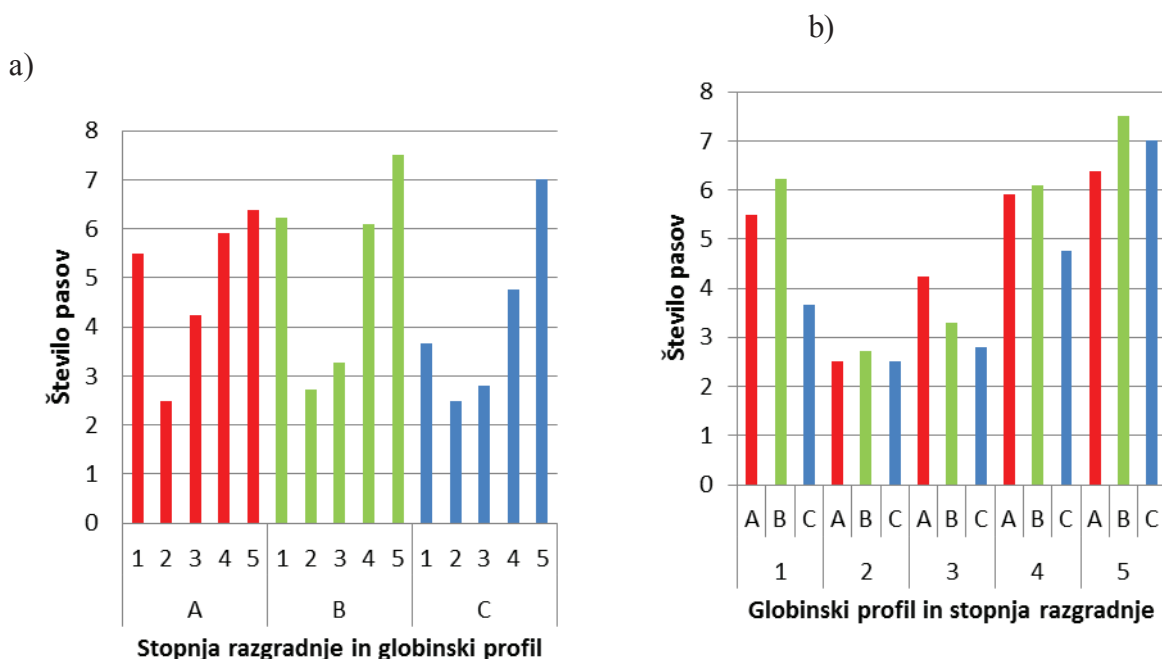
Očitno je, da se je pri primerjavi povprečnega števila pasov znotraj določenega globinskega profila in določene stopnje razgradnje pojavil podoben trend kot pri

povprečnih vrednostih pasov na stopnjo razgradnje (slika 16a), po drugi strani pa drugačna predstavitev istih podatkov (slika 16b) pokaže največji padec pestrosti v prvi stopnji razgradnje na prehodu iz profila B v profil C. V drugi stopnji so vrednosti v vseh profilih precej izenačene, nato pa sledi izmenjavanje pestrosti brez očitnega trenda.

Za zanesljivejše raziskave bi bilo nujno potrebno povečanje števila vzorcev. Teh skupno sicer ni malo, a če jih razdelimo na pet stopenj razgradnje ter nato na dodatne tri globinske profile, to pomeni, da smo ponekod za določen parameter globinskega profila v stopnji razgradnje sklepali na podlagi petih vzorcev.

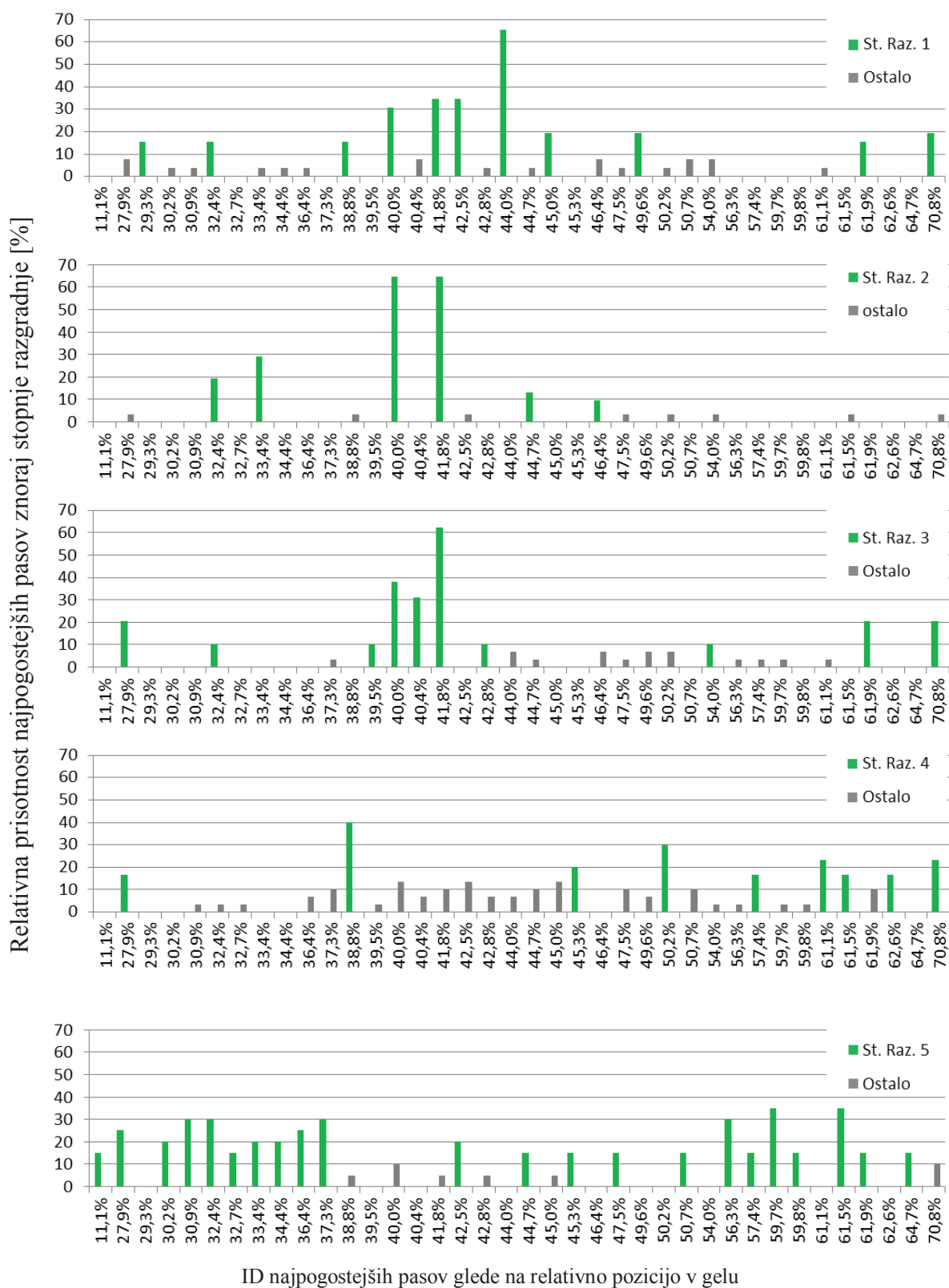
Preglednica 7: F_{st} vrednosti med posameznimi globinskimi profili

	1	2	3
1	0.00000		
2	0.00124	0.00000	
3	0.00497	-0.00329	0.00000



Slika 16: Povprečno število pasov v določeni stopnji razgradnje glede na globinski profil (a) in povprečno število pasov v globinskem profilu glede na posamezno stopnjo razgradnje (b)

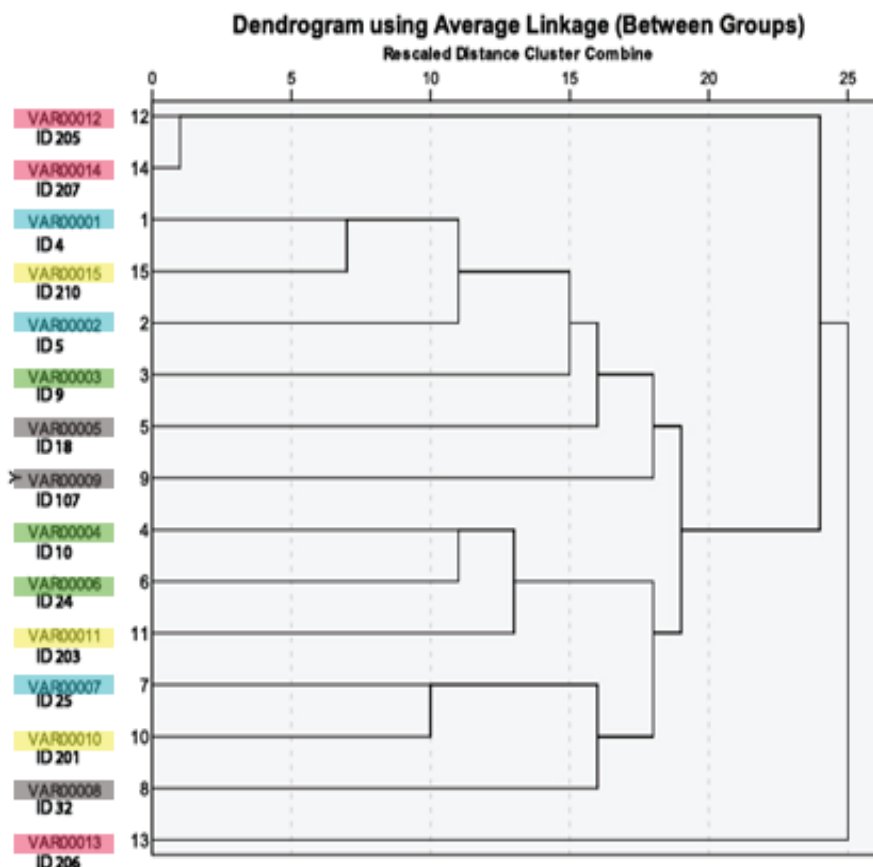
Zanimivo je spremljati sukcesijo petih najpogostejših gliv ali sevov po stopnjah razgradnje (slika 17). Tako se najpogostejša oznaka (41,8 %) in oznaka 40 %, v velikih frekvencah pojavljata v začetnih treh fazah nato pa izgineta. Nasprotno gliva z oznako 27,9 ni prisotna v začetnih fazah razkroja in se začne pojavljati šele od tretje stopnje dalje. Nekatere glive pa ne kažejo očitnih odvisnosti od stopnje razgradnje (61,9 %; 32,4 %).



Slika 17: Predstavitev petih najpogostejših pasov v določeni stopnji razgradnje (zelena barva). S sivo barvo so označeni ostali prisotni pasovi znotraj unije najpogostejših.

5.2.2 Razvrščanje v skupine na podlagi Diceovih koeficientov

Program SPSS sam izriše dendrogram podobnosti DGGE profilov gliv na podlagi Diceovih koeficientov (slika 18). Razporeditev ni podobna stopnjam razgradnje, kar kaže na to, kako veliko spremenljivk sodeluje pri naseljevanju združb gliv.



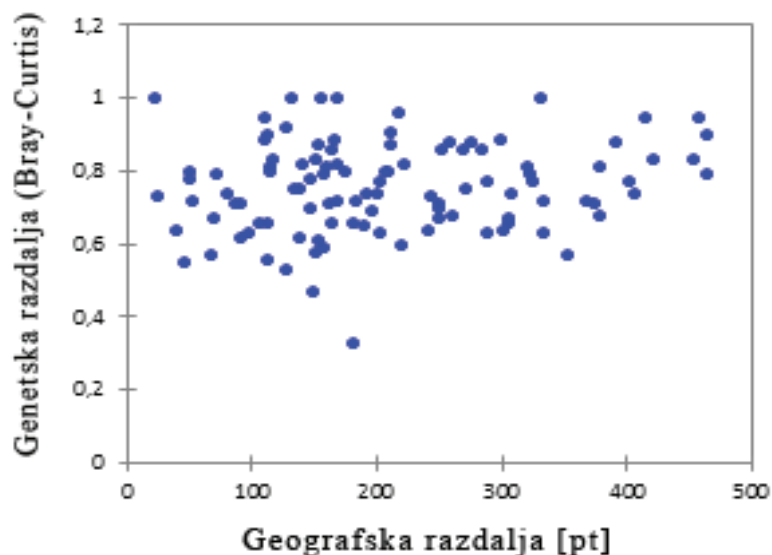
Slika 18: Dendrogram petnajstih VLO označenih z ID in zaporedno številko iz raziskovalne ploskve. Posamezne stopnje razgradnje so označene z različnimi barvami in sicer rumeno (1. st.), rdečo (2. st.), zeleno (3. st.), modro (4. st.) in črno (5. st.)

5.2.3 Ugotavljanje odvisnosti genetskih in geografskih razdalj

5.2.3.1 Mantelov test

Rezultati Mantelovega testa ($P=0,091$) so pokazali, da ni odvisnosti med matrikama genetskih (Bray-Curtisove razdalje) in geografskih razdalj (slika 19). Pri tem velja omeniti, da Mantelov test sloni na Pearsonovem korelacijskem koeficientu, kar pomeni, da

predvideva linearno odvisnost matrik, kar pa v našem primeru ni nujno. Vrednost izračunanega korelacijskega koeficienta $r(A;B)=0,161$



Slika 19: Prikaz raztrosa dveh matrik: geografskih razdalj in Bray-Curtisovih razdalj.

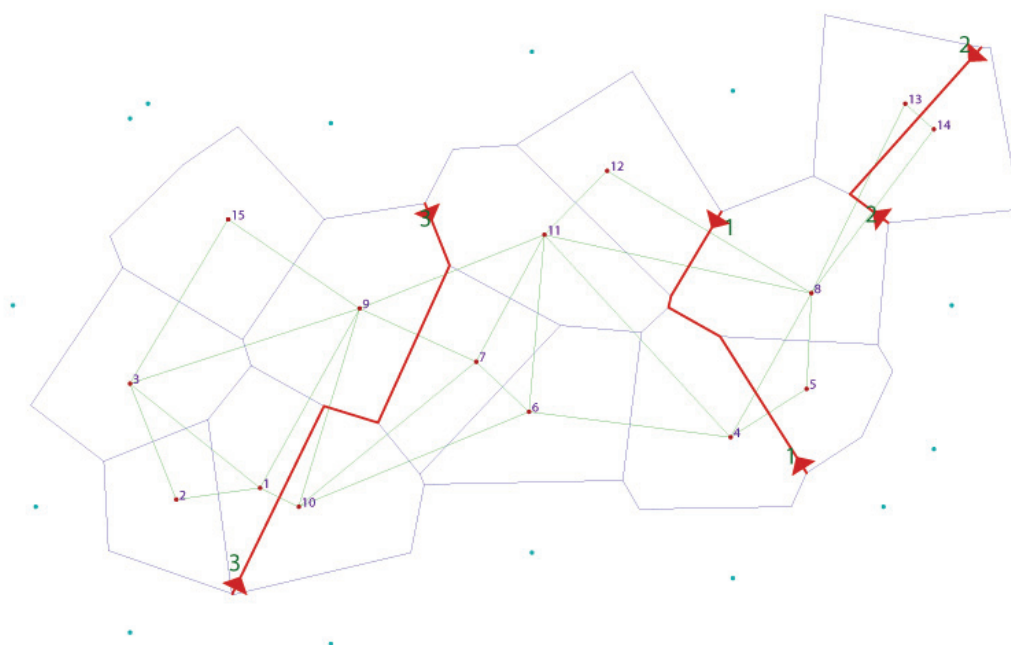
5.2.3.2 Montmonierjev Test

Slika 20 prikazuje rezultate testa. Test ne opredeli vrednosti numerično, temveč izriše prepreke (rdeča črta) med vzorci, ki so med seboj genetsko relativno oddaljeni. Vsaka prepreka je označena s številko. Večja kot je številka, manj signifikantna je prepreka.

Izrisana prepreka 1 jasno loči skupino na dve večji podenoti, medtem ko npr. druga prepreka osami zgolj drevo št. 14 od sosednjih, od katerih je drevo št. 13 geografsko izredno blizu drevesu še 14. Tudi takšen rezultat je skladen z Mantelovim testom in nakazuje, da genetske razdalje očitno niso neposredno odvisne od geografskih.

Na podlagi Montmonierjevega testa sta se ustvarili dve skupini, ki jih je razdelila prepreka 1, njuni signifikantnosti pa smo preverili z AMOVO. Skupini sta bili signifikantno različni ($P=0,000$, $F_{st}=0,0457$), vendar velja enak pomislek kot pri prejšnjem testu AMOVA. Če primerjamo vrednosti F_{st} iz preglednice 6, so tam F_{st} vrednosti večje od 0,0457, iz česar

lahko sklepamo, da so stopnje razkroja primernejše skupine za porazdeljevanje vzorcev, kot pa porazdelitev v prostorsko ločene skupine. Razlog za to je najverjetneje v majhnih geografskih razdaljah med drevesi. Najdaljša razdalja med proučevanimi razdaljami je znašala cca. 130 m.



Slika 20: Rezultat Mantel test. Izrisanje so bile tri prepreke (z rdečo črto). Vzorci (označeni z zaporednimi številkami), so med seboj ločeni s poligonom. Če si vzorca delita stranico poligona ju program Barrier obravnava kot sosednja vzorca

5.2.3.2 Test SAMOVA

Na podlagi geografskih in genetskih razdalj je test razdelil vzorce v tri skupine (uporabnik programa ima možnost izbire števila skupin), vendar te niso bile podobne tistim, ki jih je izrisal Mantel (slika 20), temveč je test ločil v svojo skupino vzorec 9, v svojo skupino vzorec 5 in preostalih 13 združil v svojo skupino. Spet je potrebno omeniti, da test SAMOVA sloni na AMOVI in torej uporablja manj zanesljive F_{st} vrednosti.

6 SKLEPI

6.1 GOSTOTE VLO

Merilna tehtnica Sartorius MSA 323S z dodatkom za merjenje gostot YDK01 se je izkazala za izjemno hitro in preprosto metodo merjenja gostot lesa. Alternativa živosrebrni metodi pa ta vendarle ni, saj ne omogoča merjenja vseh vrst gostot, ki jih lahko obravnavamo v raziskavah. Za namen ugotavljanja gostot VLO obravnavanje vseh vrst gostot seveda ni potrebno, potrebno pa je poenotenje zavoljo statistične primerljivosti rezultatov v različnih časovnih obdobjih. Ugotavljanje osnovne gostote, ki je v raziskavah o VLO med najbolj uporabljenimi (Kraigher in sod., 2002; Teodosiu in Bouriaud, 2012; Weggler in sod., 2012; Fraver in sod., 2002), je s to metodo mogoče. Za standardizacijo postopka pa bo potrebnih več raziskav v smeri merjenja večjih vzorcev (cca. 6-15 cm³), drugače pridobljenih vzorcev (z vrtanjem, izsekavanjem, žaganjem) in drugačnega ravnanja z vzorci (zmrzovanje, vakuumiranje) (Kraigher in sod., 2002; Teodosiu in Bouriaud, 2012; Weggler in sod., 2012; Fraver in sod., 2002).

Vakuumiranje in merjenje vzorcev velikostnega razreda 10cmx10cmx10cm na izbrani tehtnici omogoča manj razpada visoko razgrajenih vzorcev lesa, hkrati pa velikost zagotavlja manj variabilnosti znotraj iste stopnje razkroja (Weggler in sod., 2012). Meritve takih vzorcev na tehtnici Sartorius MSA 323S niso mogoče. A merjenje gostot v vodi na podlagi vzgona, je stara, poceni in preprosta metoda, ki jo lahko hitro izvedemo na praktično kakršnikoli laboratorijski tehtnici z manjšimi inženirskimi dopolnitvami (Olesen 1971).

Raziskava o gostotah VLO je potrdila prvi dve hipotezi te diplomske naloge.

- Metoda merjenja gostot VLO v vodnem mediju na tehtnici Sartorius 323S je primerna za raziskave stopnje razkroja VLO.

- Rezultati, izmerjeni v vodnem mediju, niso primerljivi z rezultati, izmerjenimi v živosrebrnem mediju.

6.2 PESTROST GLIVNIH ZDRUŽB

Izbrana metoda za ugotavljanje pestrosti glivnih združb (DGGE) se je izkazala za izjemno informativno, saj omogoča vpogled v pestrost in strukturo združbe gliv, ki je s klasičnimi tehnikami doslej nismo mogli zabeležiti. Ne zahteva specializiranega znanja določevanja taksonov, vendar zahteva, zaradi velike različnosti vzorcev iz vidika količine tarčne DNA in inhibitorjev PCR, veliko mero optimizacije pogojev PCR in prilagajanja količine nanesene na DGGE gel. Rezultati so pokazali, da metoda ne daje rezultatov primerljivih s klasičnimi metodam popisa (slika 2 in 13), saj z njo zajamemo predvsem micelijsko DNA in tudi glivne vrste, ki jih s klasičnimi metodami ne zajamemo (Stokland in Siitonen, 2012). Natančnejša primerjava obeh pristopov pa bi bila možna, če bi izvedli tudi ugotavljanje nukleotidnega zaporedja posameznih pasov DGGE in nadaljnjo identifikacijo glive, ki jo posamezni DGGE pas predstavlja, na osnovi primerjave ugotovljenega nukleotidnega zaporedja s tistimi v bazah podatkov. Vsekakor je pomembno poudariti, da s pristopom, uporabljenim v tej raziskavi, dobimo neposreden vpogled v strukturo glivne združbe in zaznamo tudi glive, ki jih zaradi odsotnosti trosnjakov ali nezmožnosti gojenja v laboratoriju s klasičnim pristopom ne odkrijemo.

Opravljen raziskava je v velikem delu opravila določeno pionirsko vlogo, za zanesljivejše raziskave pa bi bilo nujno potrebno povečanje števila vzorcev.

V tem delu lahko potrdimo naslednji hipotezi.

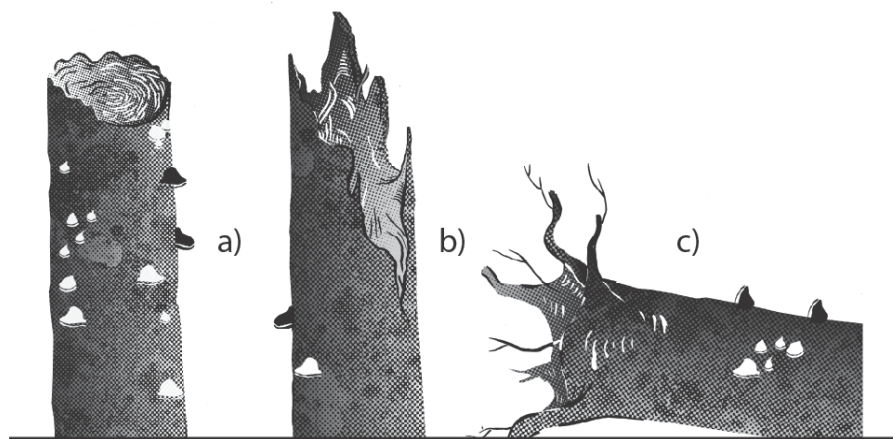
- Pestrost združbe gliv se povečuje s stopnjo razkroja.
- Vrste gliv, ki uspevajo na velikih lesnih ostankih, so odvisne od stopnje razkroja.

Zavrnamo pa hipotezi spodaj.

- Struktura združbe gliv je odvisna od geografske lokacije vzorca VLO.
- Združba gliv se spreminja z oddaljenostjo od zunanjšega oboda do središča VLO.

Pri vplivu naseljevanja gliv na VLO imamo opraviti s sistemom z veliko spremenljivkami. Na terenu in v laboratoriju se je v okviru te diplomske naloge poleg tu predstavljenih podatkov pridobilo tudi podatke o vlagi vzorcev VLO, podatke o načinu podrtja drevesa ter precej meta podatkov. Obseg teh podatkov je presegal obseg diplomske naloge, a njihovo proučevanje je nujno za holističen pristop k razumevanju sukcesije gliv v VLO in njihovega vpliva na razgradnjo. Prav tako je za ugotavljanje dinamike nujno periodično spremljanje teh podatkov. Zato z željo, da ta diplomska naloga ne bo enkraten primer takšnih raziskav, navajamo tri možnosti za nadaljnje raziskave.

Ko je drevo na tleh, njegova razgradnja poteka izjemno različno (Boddy, 2011). Zadnja revizija stopenj razgradnje je pokazala, da se je v 12-13 letih stopnja razkroja nekaterih dreves spremenila za kar tri stopnje, medtem ko je ponekod stopnja razkroja ostala ista! Hitrost razkroja je odvisna od tega, ali je drevo odmrlo zaradi napada gliv ali pa ga je, še vitalnega, podrla sosednje drevo. Razlog padca drevesa je dokaj enostavno oceniti na terenu (slika 21).



Slika 21: Razlogi za odmrtnost drevesa. Indici za odmrtnost zaradi gliv (a): panj je visok približno tretjino drevesne višine, panj je zgoraj odlomljen skorajda horizontalno, pravilno, na panju je ogromno trosnjakov gliv. Indici za odmrtnost zaradi trka z drugim drevesom, ali okoljskih vplivov (b): višina panja je različna, panj je zgoraj odlomljen poševno, nepravilnih oblik, na panju je malo ali nič trosnjakov gliv. Indici za odmrtnost zaradi okoljskih vplivov (c): Panja ni, drevo je izruvano s koreninami, orientacija trosnjakov govori o tem ali so bile glive prisotne že pred odmrtnostjo drevesa ali po njej (Ilustracija: Domen Finžgar, 2013)

Ustrezna izbira in interpretacija statističnih metod za obravnavo genetskih podatkov je nujna za relevantnost naših rezultatov. Ker gre za področje, ki se hitro razvija in nadgrajuje, velja uporabiti določeno mero previdnosti pri interpretaciji kazalnikov diferenciacij med populacijami oz. skupinami, saj se je glede na zadnje izsledke izkazalo, da najpogosteje uporabljen kazalnik diferenciacije F_{st} ne kaže vedno realne slike (Merimans in Hedrick, 2011). Posledično velja preučiti ustreznost uporabe novejših kazalnikov (D (Jost 2008), $G'st$ (Hedrick 2005), $F'st$ (Merimans 2006) za naš tip podatkov.

Zadnje predlagano nadaljevanje raziskav je ugotavljanje nukleotidnih zaporedij posameznih pasov v DGGE profilih. S tem bi poleg podatkov o pestrosti gliv in goli strukturi združb, dobili tudi podatke o dejanski identiteti vrst in sevov po stopnjah/globinskih profilih. Pred ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja bi bilo priporočljivo izolirati tudi plesen, ki se je nabrala med sušenjem, jo identificirati in izločiti iz rezultatov, čeprav zaradi načina odvzema vzorca za ekstrakcijo DNA njena prisotnost najverjetneje ni bistveno vplivala na rezultate.

7 POVZETEK

Ugotavljanje vpliva gliv na razgradnjo VLO v pragozdnem rezervatu smo razčlenili na dva dela. Prvi se je ukvarjal z ugotavljanjem zmanjševanja gostot VLO s stopnjo razgradnje, drugi pa z opisom pojavnosti gliv v vzorcih VLO z metodo DGGE. Določanje stopenj razgradnje in vzorčenje za raziskave je bilo opravljeno na raziskovalni ploskvi na južnem robu pragozdnega rezervata Rajhenavski Rog. Največ težav je predstavljalo določevanje stopenj razgradnje, saj gre za subjektiven proces.

Merjenje gostot lesnih vzorcev z živosrebrnim volumetrom je v slovenskem gozdarstvu standard. Z namenom ugotavljanja zanesljivosti drugačnih, zdravju varnejših metod ugotavljanja gostot, so bile meritve opravljene tako na živosrebrnem kot tudi na vodnem volumetru. Pri tem je bila pilotno uporabljena tehnika Sartorius MSA 323S z dodatkom za merjenje gostot YDK01. Dobljeni rezultati niso bili primerljivi zaradi različnih definicij gostot. Merili smo osnovne, nasičene in absolutne gostote. Po pričakovanjih sta nasičeni in osnovni gostoti pokazali trend padanja gostot. Pri absolutnih gostotah tega nismo uspeli dokazati, verjetno zaradi slabo ocenjenih stopenj razgradnje. Tehnika Sartorius se je izkazala za zanesljivo in hitro metodo merjenja gostot v vodi, ki pa jo bo potrebno še optimizirati.

Molekularne metode ugotavljanja prisotnosti gliv v VLO so v Sloveniji v razvoju. Na podlagi ekstrakcije glivne DNA iz vzorcev VLO smo s pomočjo analitske metode DGGE uspeli pridobiti profile združb gliv za posamezni vzorec. Ugotavljanje nukleotidnih zaporedij ni bilo izvedeno. Na podlagi profilov smo preučili sukcesijo gliv po različnih stopnjah razkroja, njihovo pestrost po globinskih profilih in stopnjah razkroja. Posebej smo proučevali še povezanost genetske oddaljenosti ugotovljene iz primerjave DGGE profilov (Bray-Curtis) z geografskimi razdaljami. Rezultati so pokazali, da so nekatere glive značilne za začetne stopnje razkroja, druge pa za končne stopnje. Pestrost profilov se s stopnjo razkroja večja, odstopa le stopnja razkroja 1, ki ima nepričakovano veliko stopnjo pestrosti. Genetska povezanost v večji meri ni bila odvisna od stopenj razgradnje,

variabilnosti med vzorci je bila visoka. Povezave med genetskimi in geografskimi razdaljami niso bile ugotovljene. Tekom statističnih analiz se je pokazala potreba po primerjavi različnih kazalnikov diferenciacij med skupinami, saj so je za določene uveljavljene kazalnike izkazalo, da niso univerzalno ustrezni za vse tipe podatkov in primere.

8 VIRI

Anderson I. C., Campbell C. D., Prosser J. I. 2003. Diversity of fungi in organic soils under a moorland – Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology*, 5: 1121-1132.

Allmér J., Vasiliauskas R., Ihrmark K., Stenlid J., Dahlberg A. 2006. Wood-inhabiting Fungal Communities in Woody Debris of Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.), as Reflected by Sporocarps, Mycelial Isolations and T-RFLP Identification. *FEMS Microbiology Ecology*, 55: 57-67

Bidartondo M. I., Gardes M. 2005. The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem. XI: Fungal Diversity in Molecular Terms: Profiling, Identification, and Quantification in the Environment. Dighton J., White J.F., Oudemans P. (ur.). 3th ed. Boca Raton, CRC Press: 215-239

Bončina A. 1999. Stand Dynamics of the Virgin Forest Rajhenavski Rog (Slovenia) During the Past Century. V: Virgin Forests and Forest Reserves in Central and East European Countries. Diaci J. (ed.). Ljubljana, Department of Forestry and Renewable Forest Resources - Biotechnical Faculty: 95-110

Boddy L. 2001. Fungal community ecology and decomposition processes: From standing tree to complete decay of coarse woody debris. *Ecological Bulletins*, 49: 43-56

Dice R. L. 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* 3: 297-302

Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581.

Ericson B. 1966. Determination of Basic Density in Small Wood Samples. Department of Forest Yield Research: Research Notes, 9: 1-34

Excoffier L., Smouse E. P., Quattro J. M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479-491

Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.

Finžgar D., Rupel M., Humar M., Kraigher H. 2013. Ugotavljanje gostot velikih lesnih ostankov bukve (*Fagus sylvatica* L.) iz pragozdnega rezervata Rajhenavski Rog. *Les*, 65, 1-2: 41-48

Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.

Grebenc T., Bajc M., Kraigher H. 2009. Razkroj lesa in biotska raznovrstnost gliv in bakterij v opadu naravnih sestojev z bukvi. V: Trajnostna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi. Humar M., Kraigher H. (ur.). Ljubljana, Silva Slovenica: 47-54

Fraver S., Wagner G. R., Day M. 2002. Dynamics of coarse woody debris following gap harvesting in the Acadian forest of central Maine U.S.A. *Canadian Journal of Forest Research*, 32: 2094-2105

Hartman T. 1999. Hundred Years of Virgin Forest Conservation in Slovenia. V: Virgin Forests and Forest Reserves in Central and East European Countries. Diaci J. (ed.). Ljubljana, Department of Forestry and Renewable Forest Resources - Biotechnical Faculty: 111-120

Hedrick P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59:1633–1638.

Heinrichs J. F., Lassen L. E. 1970. Improved Technique for Determining the Volume of Irregularly Shaped Wood Blocks. *Forest Products Journal*, 20: 24

Hočevar S., Batič F., Martinčič A., Piskernik M. 1985. Predinarski gorski pragozdovi Trdinov vrh in Ravna gora na Gorjancih, Kopa v Kočevskem Rogu in Krokari na hrbtnu pogorja Borovška gora. (Strokovna in znanstvena dela 76). Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije: 267 str.

Hočevar S., Batič F., Piskernik M., Martinčič A., Jurc D. 1995. Glive v pragozdovih Slovenije. III, Dinarski gorski pragozdovi na Kočevskem in v Trnovskem gozdu. (Strokovna in znanstvena dela, 117). Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije: 320 str.

Holz D., Plickat H. 1961. Über die Bestimmung der Darrdichte an kleinen Holzproben. Holz als Roh- und Werkstoff, 19: 55-60

Jonsson G., Siitonen J. 2012. Dead wood and sustainable forest management. V: Biodiversity in Dead Wood. Stokland JN (ed.). New York, Cambridge University Press: 302-337

Jost L. 2008. G_{st} and its relatives do not measure differentiation. Molecular Ecology, 17: 4015-4026

Kowalchuk G. A., Gerards S., Woldendorp J. W. 1997. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. Applied Environmental Microbiology. 63: 3858-3865

Kraigher H., Jurc D., Kalan P., Kutnar L., Levanič T., Rupel M., Smolej I. 2002. Beech Coarse Woody Debris Characteristics in Two Virgin Forest Reserves in Southern Slovenia. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 69: 91-134

Manni F., Guérard E., Heyer E. 2004. Geographic Patterns of (Genetic, Morphologic, Linguistic) Variation: How Barriers Can Be Detected by Using Monmonier's Algorithm. Human Biology, 76: 173-190

Mantel N. 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. Cancer Research, 27: 209-220

Merimans G. P. 2006. Using the amova framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60: 2399-2402

Merimans G. P., Hedrick W.P. 2011. Assessing population structure: F_{st} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11: 5-18

Monmonier M. 1973. Maximum-difference barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geographic Analysis*, 3: 245–261

Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 317-322

Nijnik M. 2010. Carbon Capture, Sequestration and Storage. V: Carbon Capture and Storage in Forests. Hester R. E., Harrison R. M. (ur.). Cambridge, RSC Publishing: 203-239

Ódor P., Heilmann-Clausen J., Christensen M., Aude E., van Dort K. W., Piltaveer A., Siller I., Veerkamp M. T., Walley R., Standova T., van Hees A. F. M., Kosec J., Matočec N., Kraigher H., Grebenc T. 2006. Diversity of dead wood inhabiting fungi and bryophytes in semi-natural beech forests in Europe. *Biological Conservation*, 131: 58-71

Olesen P. O. 1971. The Water Displacement Method. *Forest Tree Improvement*. 3: 3-23

Ovaskainen O., Nokso-Koivisto J., Hottola J., Rajala T., Pennanen T., Ali-Kovero H., Miettinen O., Oinonen P., Auvinen P., Paulin L., Larsson K-H., Mäkipää R. 2010. Identifying wood-inhabiting fungi with 454 sequencing – what is the probability that BLAST gives the correct species? *Fungal Ecology*, 3: 274-283

Piltaver A., Matočec N., Kosec J., Jurc D. 2002. Macrofungi on beech dead wood in the Slovenian forest reserves Rajhenavski Rog and Krokar. *Zbornik lesarstva in gozdarstva*, 69: 171-196

Rosenberg M. S., Anderson C. D. 2011. PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis: version 2. *Methods in Ecology and Evolution*, 3: 229-232

Schmit J. P., Lodge D. J. 2005. The fungal community: its organization and role in the ecosystem: V: Classical methods and modern analysis for studying fungal diversity. Dighton J., White J. F., Oudemans P. (ur.). 3th ed. Boca Raton, CRC Press: 193-214

Stenlid J., Penttilä R., Dahlberg A. 2008. Wood-Decay Basidiomycetes in Boreal forests: Distribution and Community Development. V: Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. Boddy L., Frankland J., van West P (ur.). London, Academic Press: 239-262

Stokland J. N. 2012. Wood decomposition. V: Biodiversity in Dead Wood. Stokland JN (ur.). New York, Cambridge University Press: 10-28

Stokland J. N., Siitonen J. 2012. Mortality factors and decay succession. V: Biodiversity in Dead Wood. Stokland JN (ur.). New York, Cambridge University Press: 302-337

Teodosiu M., Bouriaud B.O. 2012. Deadwood specific density and its influential factors: A case study from a pure Norway spruce old-growth forest in the Eastern Carpathians. Forest Ecology and Management, 283: 77-85

Thaler N., Bajc M. 2013. Vpliv glivnih in rastlinskih sekundarnih metabolitov na verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Acta Silvae et Ligni, 100: 25-40

Torelli N. 1998. Gostota in relativna gostota lesa. Les, 50: 52-54

Usta I. 2003. Comparative Study of Wood Density by Specific Amount of Void Volume (Porosity). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 27: 1-6

Vainio E. J., Hantula J. 2000. Direct analysis of wood living fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Mycological Research, 234: 48-59

Vintila E. 1939. Untersuchungen über Raumgewicht und Schwindmaß von Früh- und Spätholz bei Nadelhölzern. Holz als Roh- und Werkstoff, 2: 345-357

Von Wendel K. 1962. Hydrostatische Verfahren zur Bestimmung der Rohdichte von Holzproben. Holz als Roh- und Werkstoff, 20: 360-364

Wagenführ R. 1996. Holzatlas. Leipzig, Fachbuchverlag Leipzig: 688 str.

Wegglar K., Dobbertin M., Jüngling E., Kaufmann E., Thürig E. 2012. Dead wood volume to dead wood carbon: the issue of conversion. European Journal of Forest Research, 131: 1423-1438

White T. J., Bruns T. D., Lee S., Taylor J. 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. V: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (ur.). New York, Academic Press: 315-322.

9 ZAHVALA

V prvi vrsti bi se za idejno zasnovo, opredelitev problema, pobudo sodelovanja na tej diplomski nalogi, strokovno pomoč, koordinacijo vzorčenj in laboratorijskega dela, ter odzivnosti na vprašanja zahvalil mentorici prof. dr. Hojki Kraigher.

Za uvajanje v samostojno laboratorijsko delo, sodelovanje pri izvedbah DGGE in PCR analiz, veliko strokovno pomoč pri interpretaciji rezultatov, deljenju izkušenj in prijateljski odnos na delovnem mestu se zahvaljujem Marku Bajcu.

Meritve z Breulovim živosrebrnim volumetrom je opravil prof. dr. Miha Humar, ki je tudi idejno zasnoval potek merjenja gostot ter nudil strokovno pomoč pri določevanju in interpretaciji gostot VLO. Skupaj s Hojko Kraigher sta me povabila na znanstveno srečanje Gozd in les: Certificiranje v gozdarstvu in lesarstvu v okviru katerega sem predstavil del te diplome in objavil članek v reviji Les. Hvala.

Za izvedbo terenskega dela, ter pomoči pri sušenju in tehtanju vzorcev se zahvaljujem Mateju Ruplu. Hvala tudi Robertu Krajncu, ki je v Rajhenavskem Rogu izžagoval pite.

Iskreno zahvalo podajam še Barbari Štupar, Danielu Žlindri, Iztoku Sinjurju, Magdi Špenko in Nejcu Thalerju.

Delo na nalogi je bilo opravljeno v okviru projekta L4-4318, ki ga sofinancirata Javna agencija za raziskovalno dejavnost republike Slovenije in Ministrstvo za kmetijstvo in okolje.

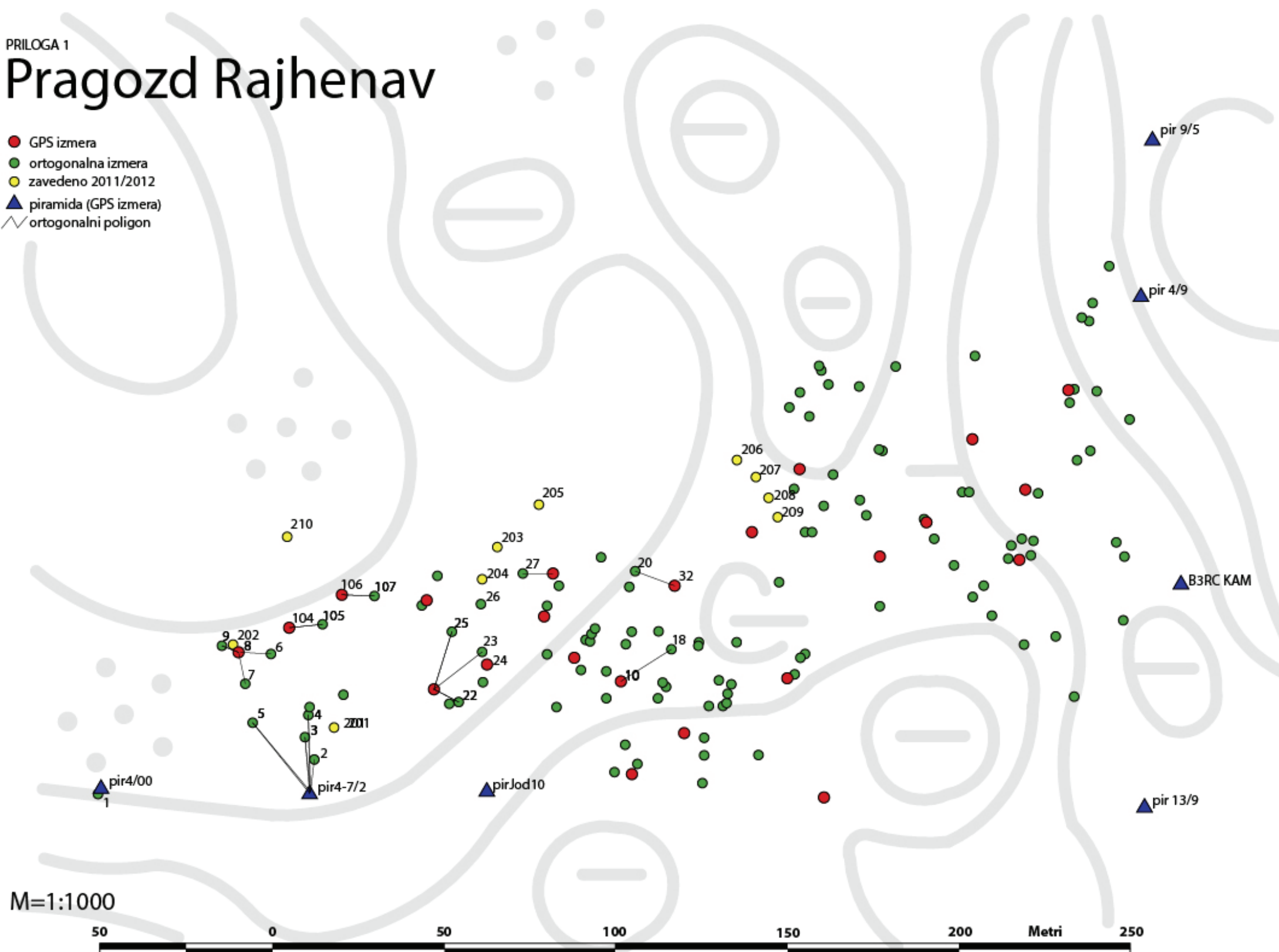
10 PRILOGE

Priloga A: Grafični prikaz popisov stopenj razgradenj iz leta 2002 in 2012

PRILOGA 1

Pragozd Rajhenav

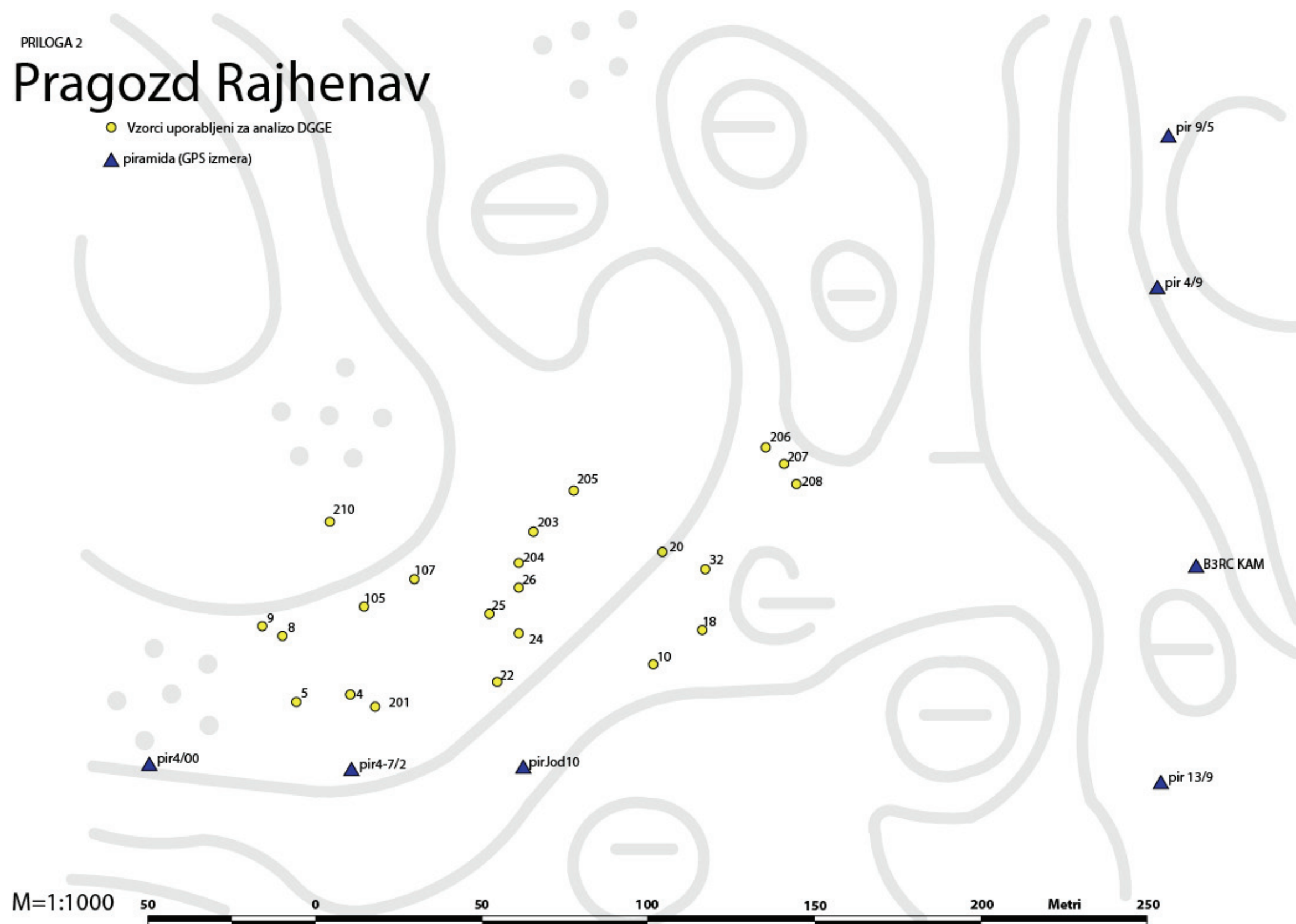
- GPS izmera
- ortogonalna izmera
- zavedeno 2011/2012
- ▲ piramida (GPS izmera)
- ∕ ortogonalni poligon



PRILOGA 2

Pragozd Rajhenav

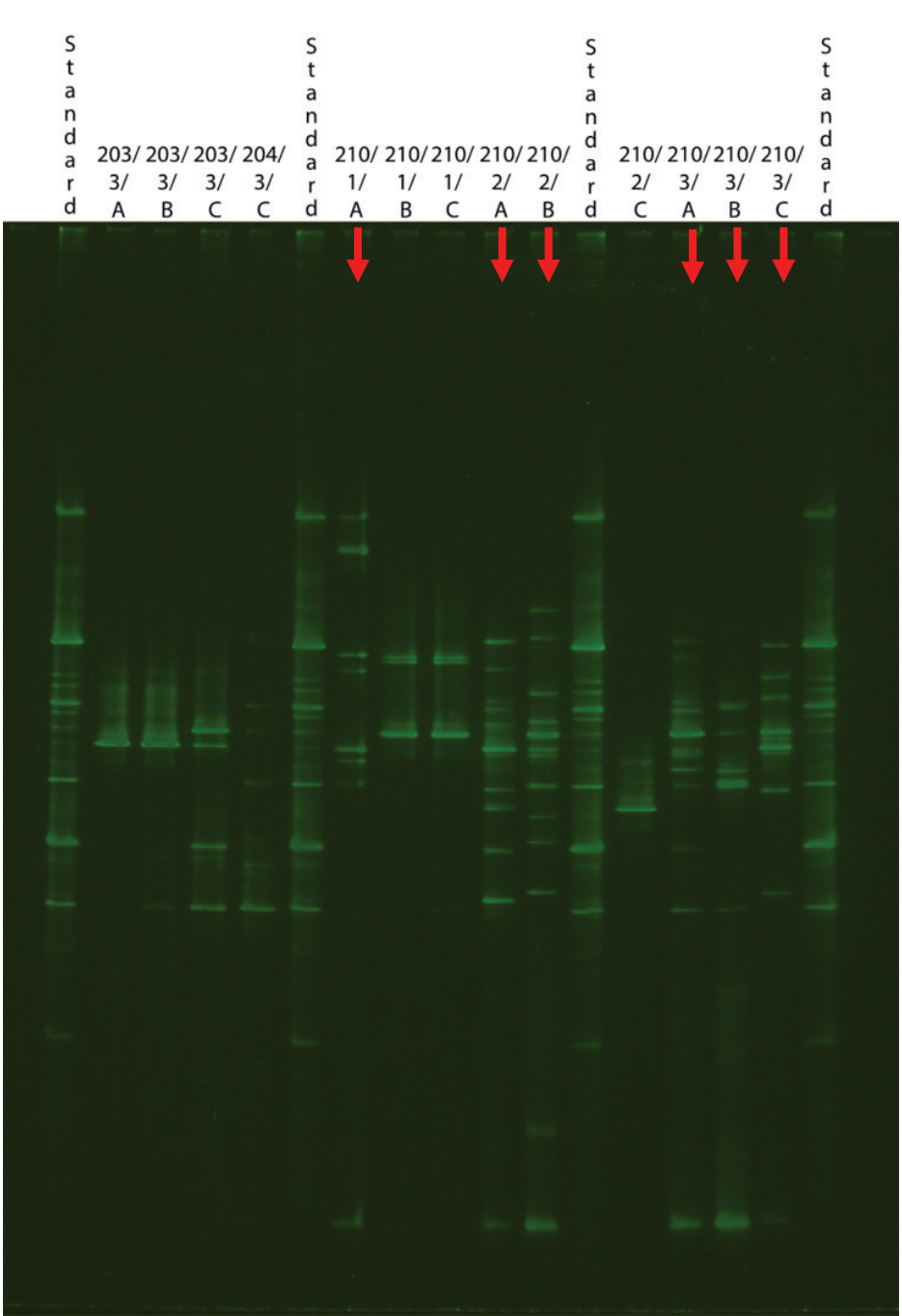
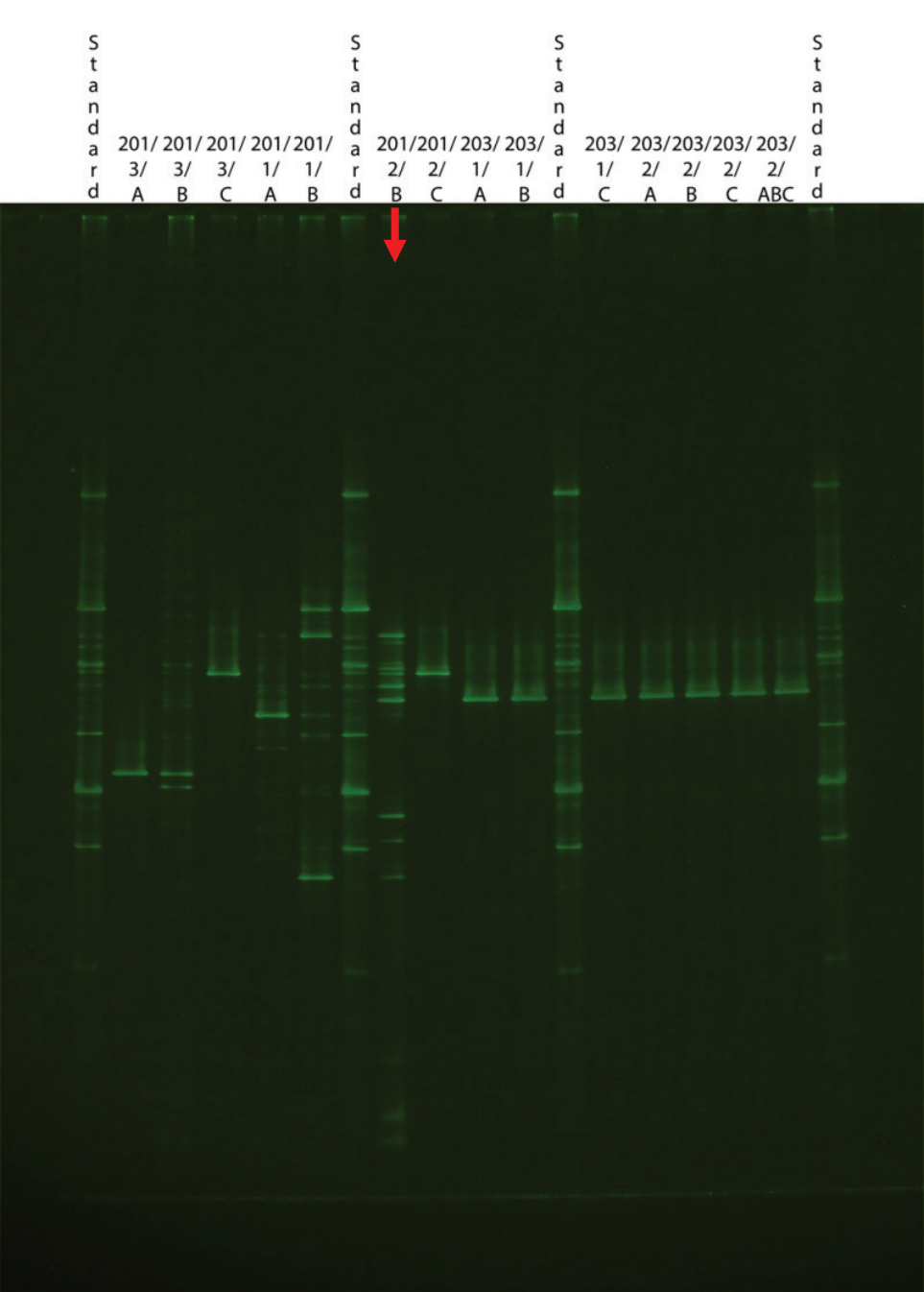
- Vzorci uporabljeni za analizo DGGE
- ▲ piramida (GPS izmera)

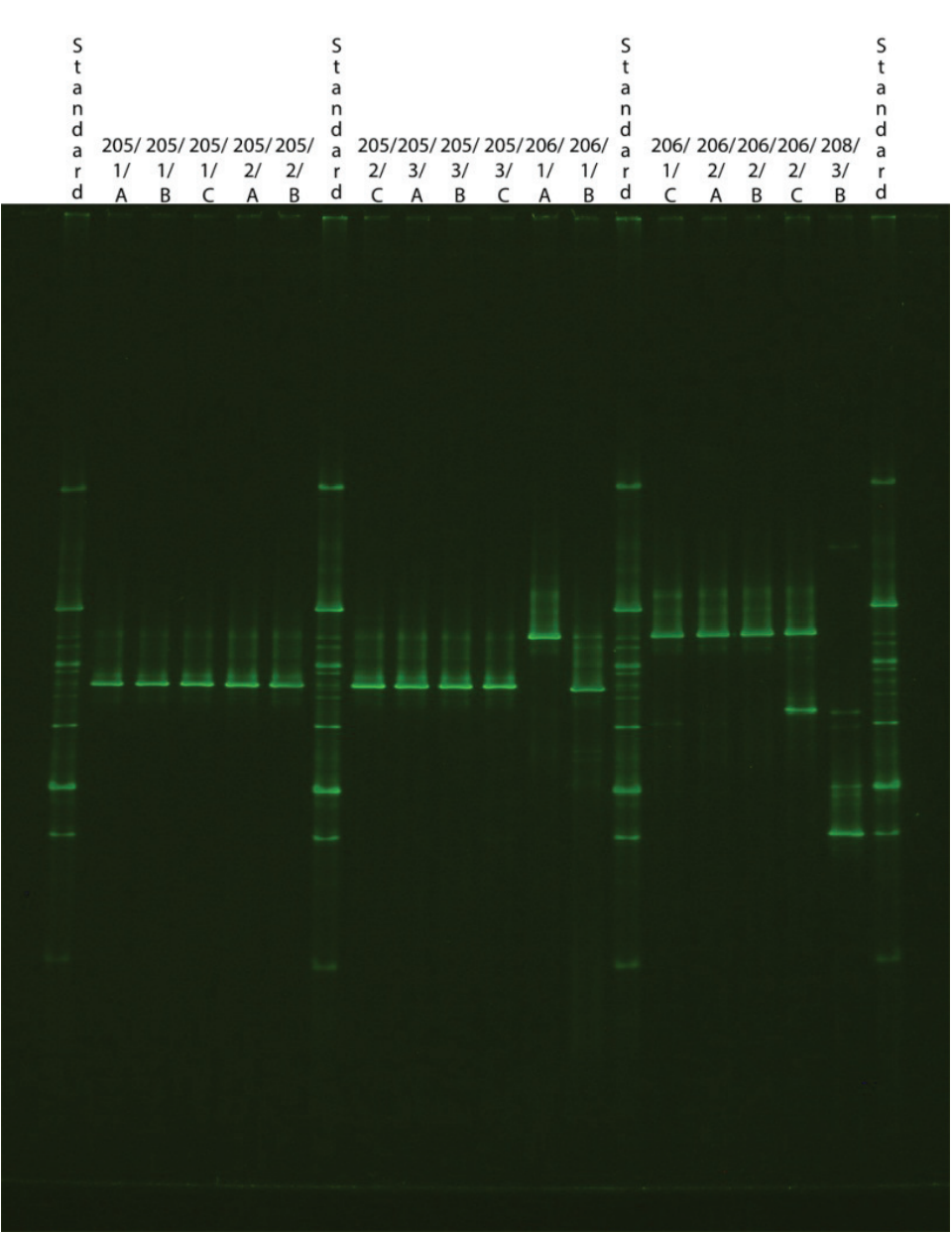


Priloga C: Preglednica vseh DGGE vzorcev, po zaporedni številki, DGGE šifri, šifri VLO na terenu, zaporedni številki pite, globinskemu profilu, Stopnji razgradnje in številu pasov na gelu

Zap. Številka	ID DGGE	ID VLO	ID pite	globinski profil	St. raz. 2013	Št. pasov	Zap. Številka	ID DGGE	ID VLO	ID pite	globinski profil	St. raz. 2013	Št. pasov	Zap. Številka	ID DGGE	ID VLO	ID pite	globinski profil	St. raz. 2013	Št. pasov
1	90	4	1	A	4	4	46	79	24	1	B	3	6	91	10	203	1	B	1	2
2	91	4	1	B	4	4	47	80	24	1	C	3	4	92	11	203	1	C	1	2
3	92	4	1	C	4	3	48	81	24	2	A	3	2	93	12	203	2	A	1	2
4	93	4	2	A	4	7	49	82	24	2	B	3	2	94	13	203	2	B	1	2
5	94	4	2	B	4	7	50	83	24	2	C	3	2	95	14	203	2	C	1	2
6	95	4	2	C	4	9	51	84	24	3	A	3	3	96	16	203	3	A	1	2
7	96	4	3	A	4	7	52	85	24	3	B	3	3	97	17	203	3	B	1	3
8	97	4	3	B	4	5	53	86	24	3	C	3	4	98	18	203	3	C	1	6
9	98	5	1	A	4	5	54	108	25	1	A	4	4	99	19	204	3	C	1	4
10	99	5	1	B	4	6	55	109	25	1	B	4	5	100	29	205	1	A	2	2
11	100	5	1	C	4	4	56	110	25	1	C	4	4	101	30	205	1	B	2	2
12	105	5	2	A	4	8	57	111	25	2	A	4	5	102	31	205	1	C	2	2
13	106	5	2	B	4	8	58	112	25	2	B	4	3	103	32	205	2	A	2	2
14	101	5	3	A	4	7	59	113	25	2	C	4	3	104	33	205	2	B	2	2
15	102	5	3	B	4	8	60	114	25	3	A	4	3	105	34	205	2	C	2	2
16	103	5	3	C	4	5	61	115	25	3	B	4	9	106	35	205	3	A	2	2
17	57	8	1	A	2	2	62	116	25	3	C	4	5	107	36	205	3	B	2	2
18	58	8	1	B	2	2	63	117	26	2	A	4	7	108	37	205	3	C	2	2
19	59	8	1	C	2	2	64	118	26	2	B	4	6	109	38	206	1	A	2	1
20	60	9	1	A	3	9	65	119	26	2	C	4	5	110	39	206	1	B	2	3
21	61	9	1	C	3	1	66	130	32	1	A	5	2	111	40	206	1	C	2	3
22	62	9	2	A	3	2	67	131	32	1	B	5	7	112	41	206	2	A	2	1
23	63	9	2	B	3	3	68	132	32	2	A	5	1	113	42	206	2	B	2	1
24	64	9	2	C	3	2	69	133	32	2	C	5	7	114	43	206	2	C	2	3
25	65	9	3	A	3	6	70	134	32	3	A	5	5	115	45	206	3	A	2	6
26	66	9	3	B	3	4	71	135	32	3	B	5	4	116	46	206	3	B	2	2
27	67	9	3	C	3	2	72	74	105	1	A	3	4	117	47	206	3	C	2	2
28	68	10	1	A	3	5	73	87	105	2	A	3	3	118	48	207	1	A	2	3
29	70	10	1	C	3	4	74	88	105	3	A	3	2	119	49	207	1	B	2	4
30	71	10	2	A	3	2	75	89	105	3	C	3	4	120	50	207	1	C	2	3
31	72	10	2	B	3	2	76	136	107	1	A	5	8	121	51	207	2	A	2	3
32	73	10	2	C	3	2	77	137	107	1	B	5	8	122	52	207	2	B	2	3
33	75	10	3	A	3	4	78	138	107	2	A	5	9	123	53	207	2	C	2	3
34	76	10	3	B	3	3	79	139	107	2	B	5	10	124	54	207	3	A	2	3
35	77	10	3	C	3	3	80	127	107	3	A	5	9	125	55	207	3	B	2	3
36	120	18	1	B	5	10	81	128	107	3	B	5	7	126	56	207	3	C	2	3
37	121	18	2	A	5	9	82	129	107	3	C	5	7	127	44	208	3	B	2	6
38	122	18	2	B	5	6	83	5	201	1	A	1	9	128	20	210	1	A	1	7
39	123	18	2	C	5	9	84	6	201	1	B	1	8	129	21	210	1	B	1	3
40	124	18	3	A	5	8	85	7	201	2	B	1	9	130	22	210	1	C	1	4
41	125	18	3	B	5	8	86	8	201	2	C	1	2	131	23	210	2	A	1	11
42	126	18	3	C	5	5	87	2	201	3	A	1	1	132	24	210	2	B	1	11
43	104	20	3	A	4	10	88	3	201	3	B	1	8	133	25	210	2	C	1	3
44	107	22	1	A	4	4	89	4	201	3	C	1	1	134	26	210	3	A	1	10
45	78	24	1	A	3	9	90	9	203	1	A	1	2	135	27	210	3	B	1	10
														136	28	210	3	C	1	9

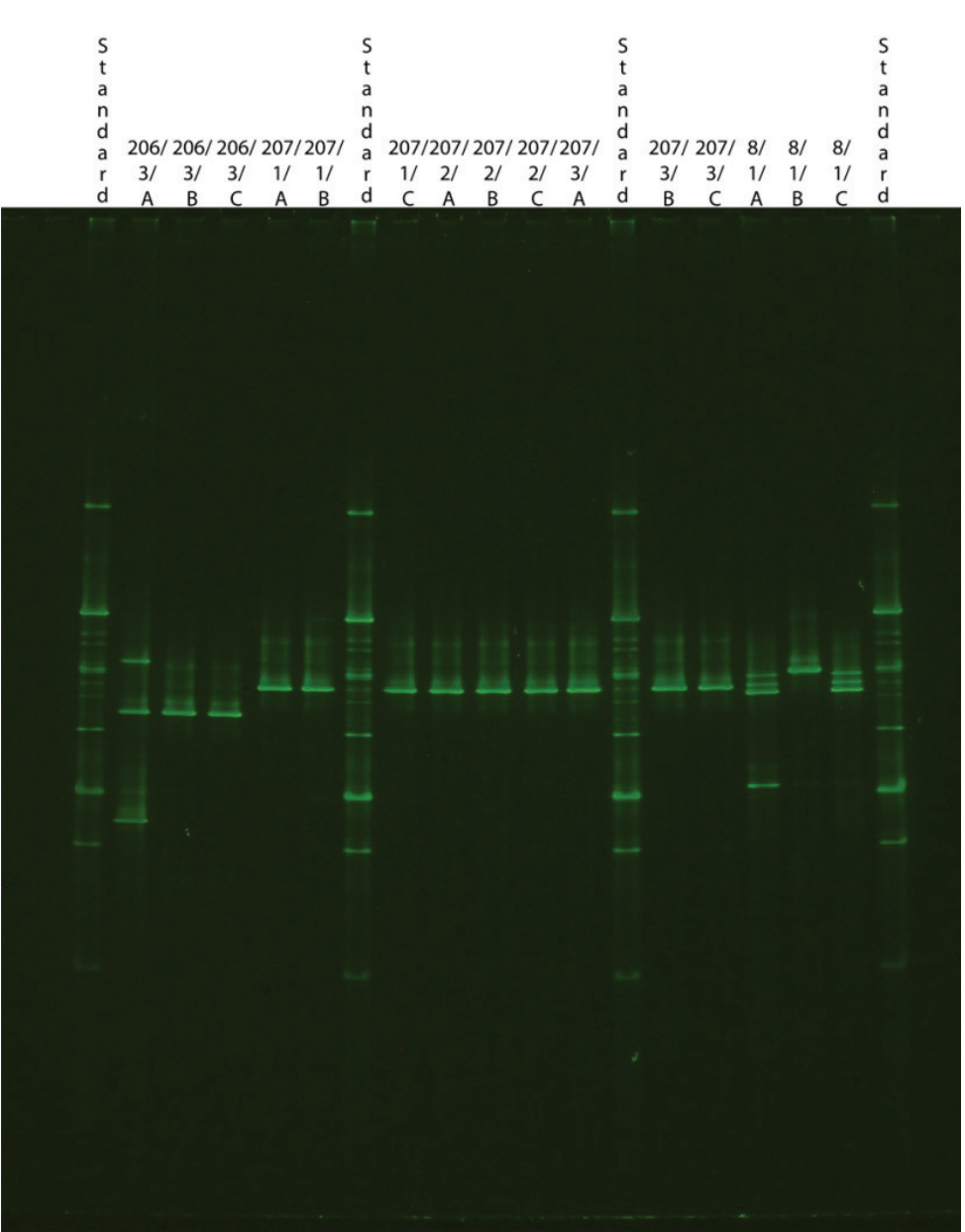
Priloga D: Slikovni rezultati DGGE analize. Z rdečimi puščicami so označeni tisti vzorci, ki smo jih zaradi majhnih količin PCR produktov morali na gel nanesti v velikih volumnih (14-20μl).





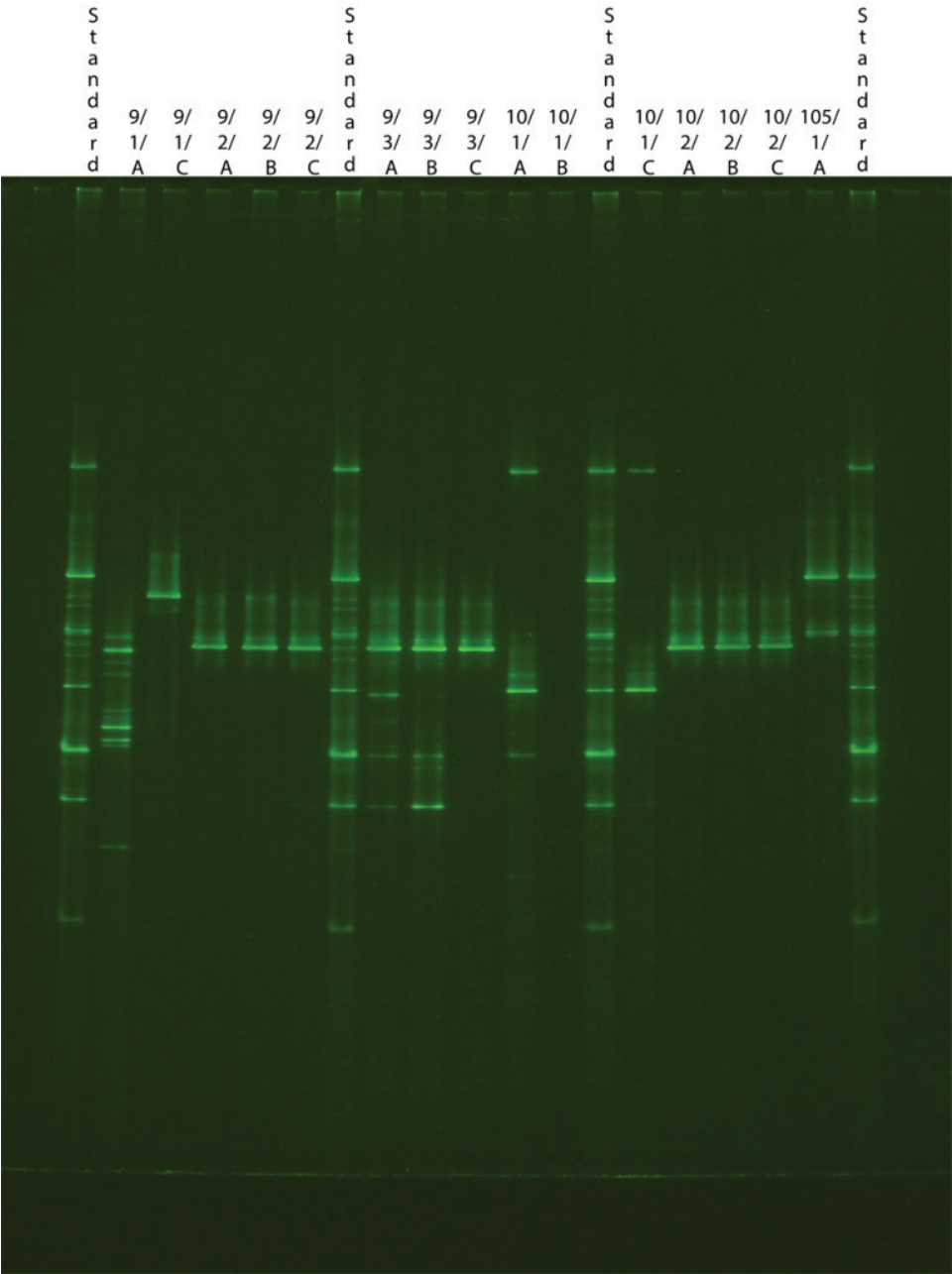
Stopnja
razgradnje
2,

gel A

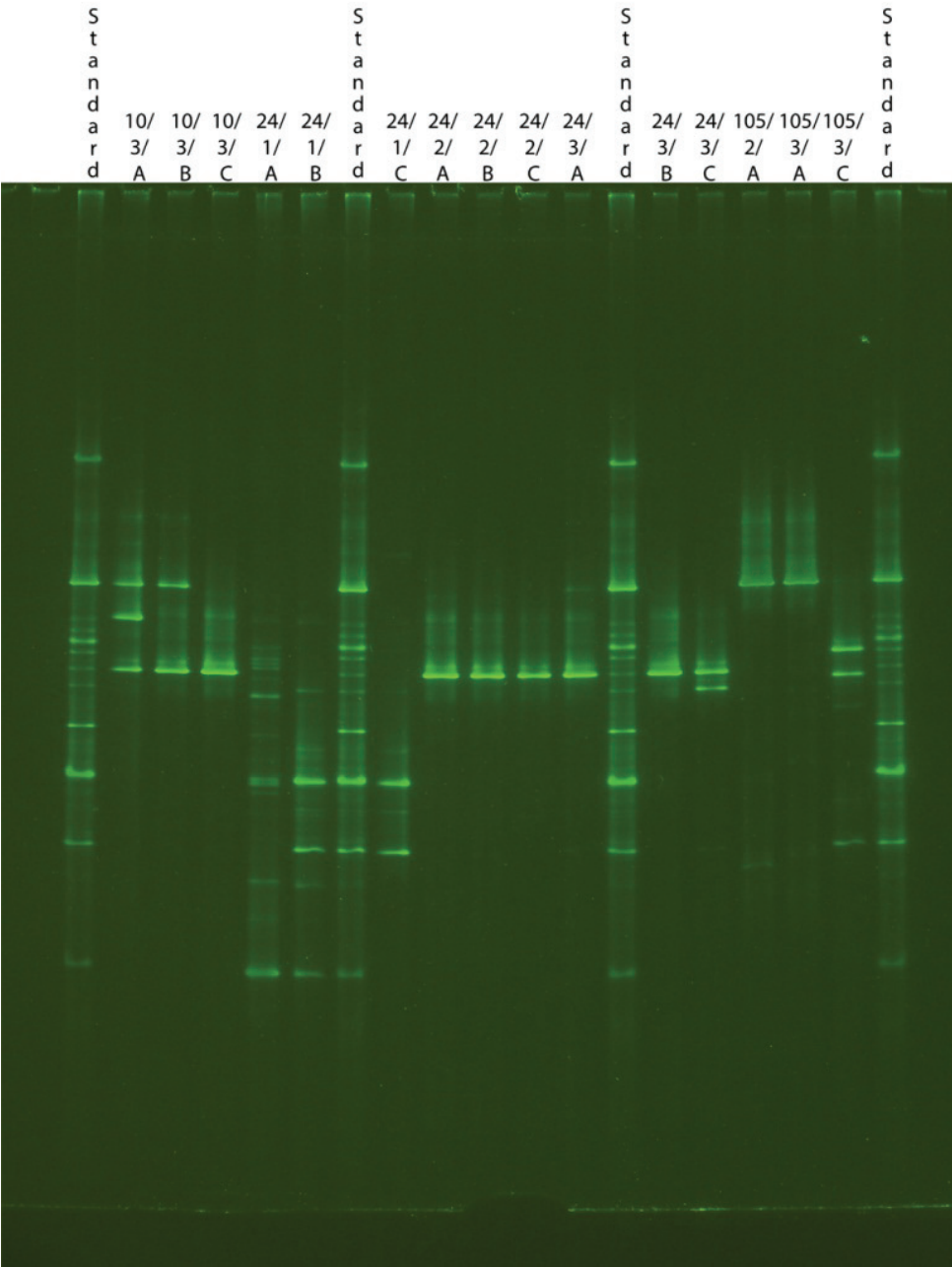


Stopnja
razgradnje
2,

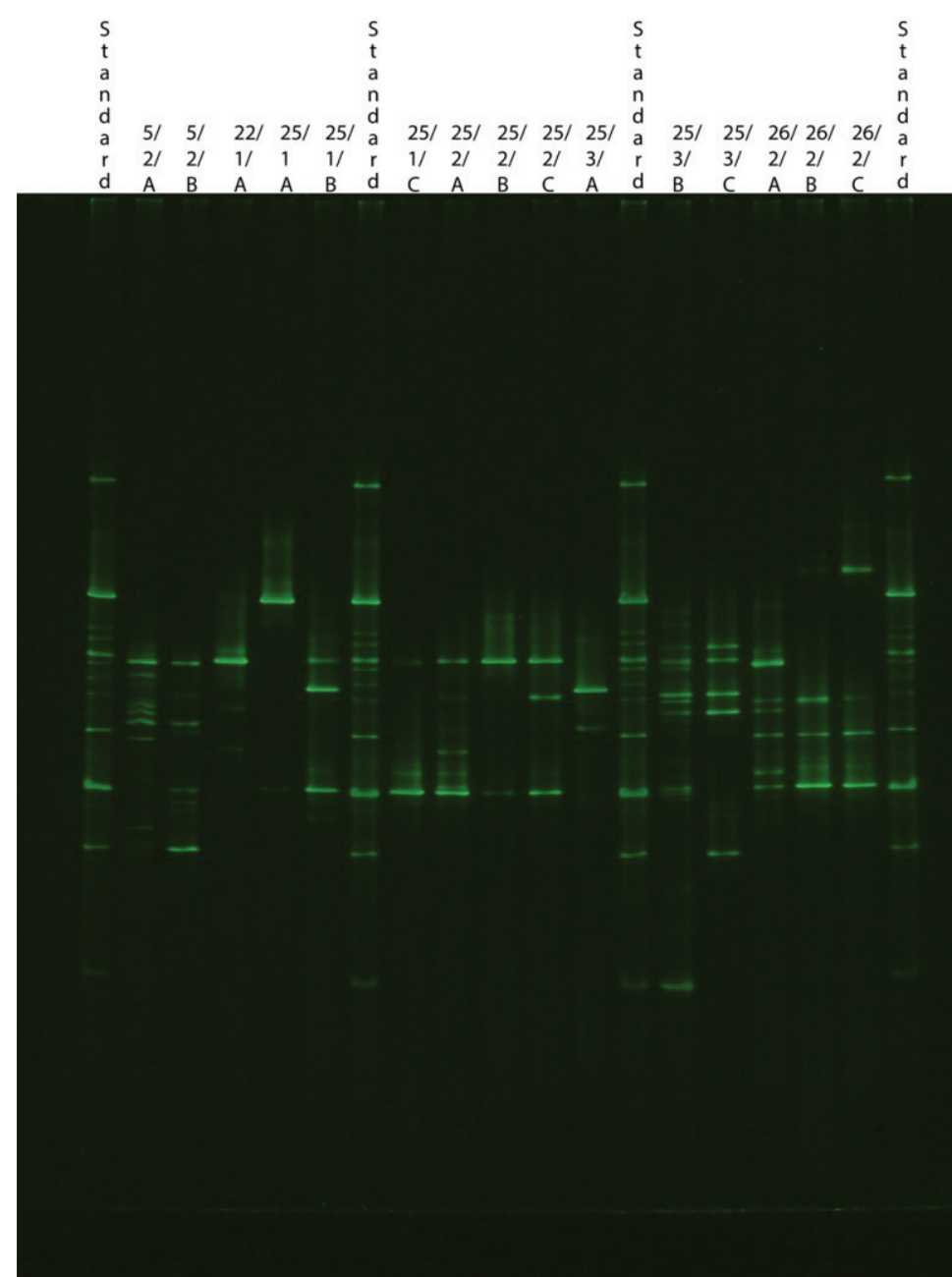
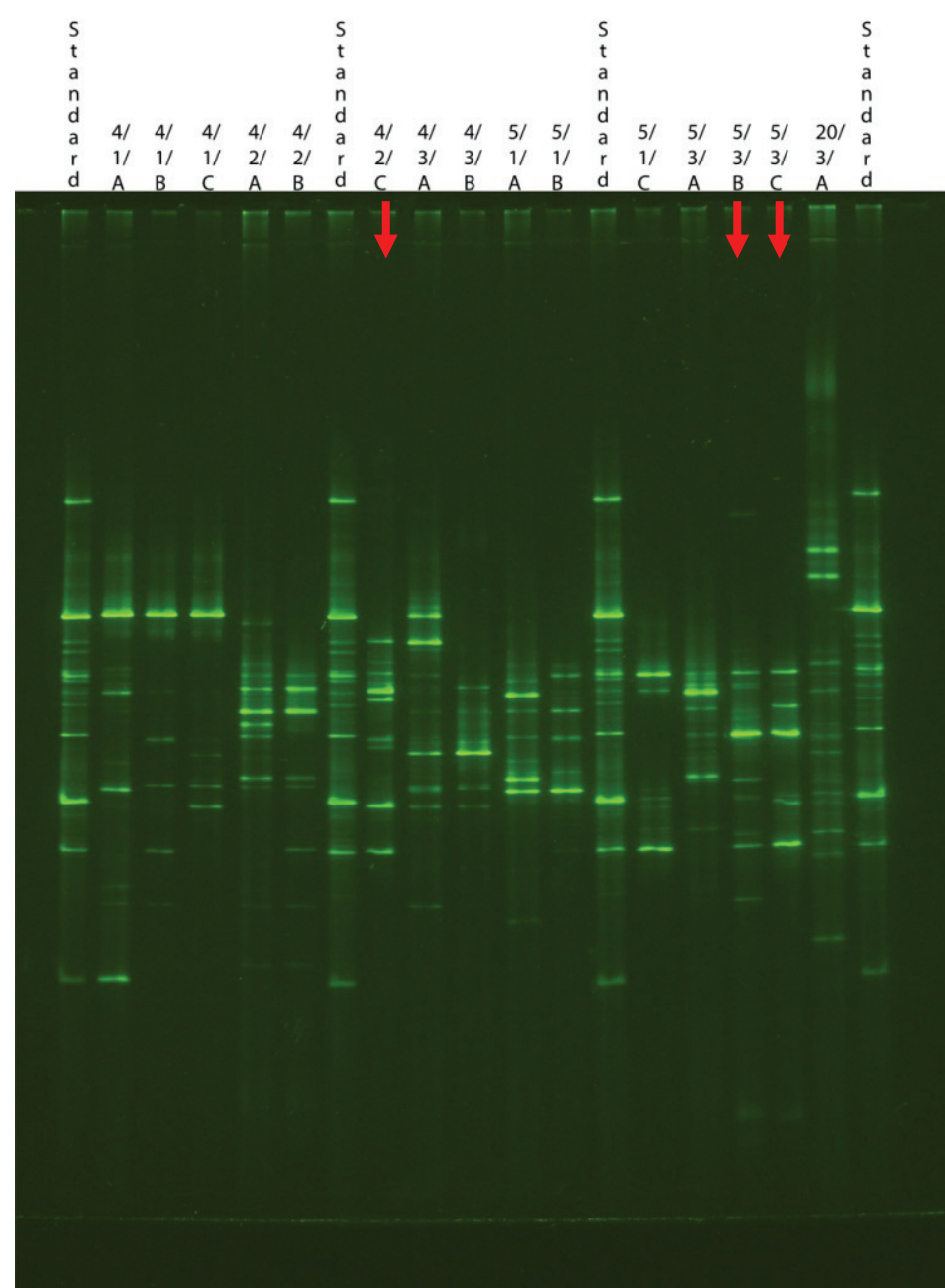
gel B

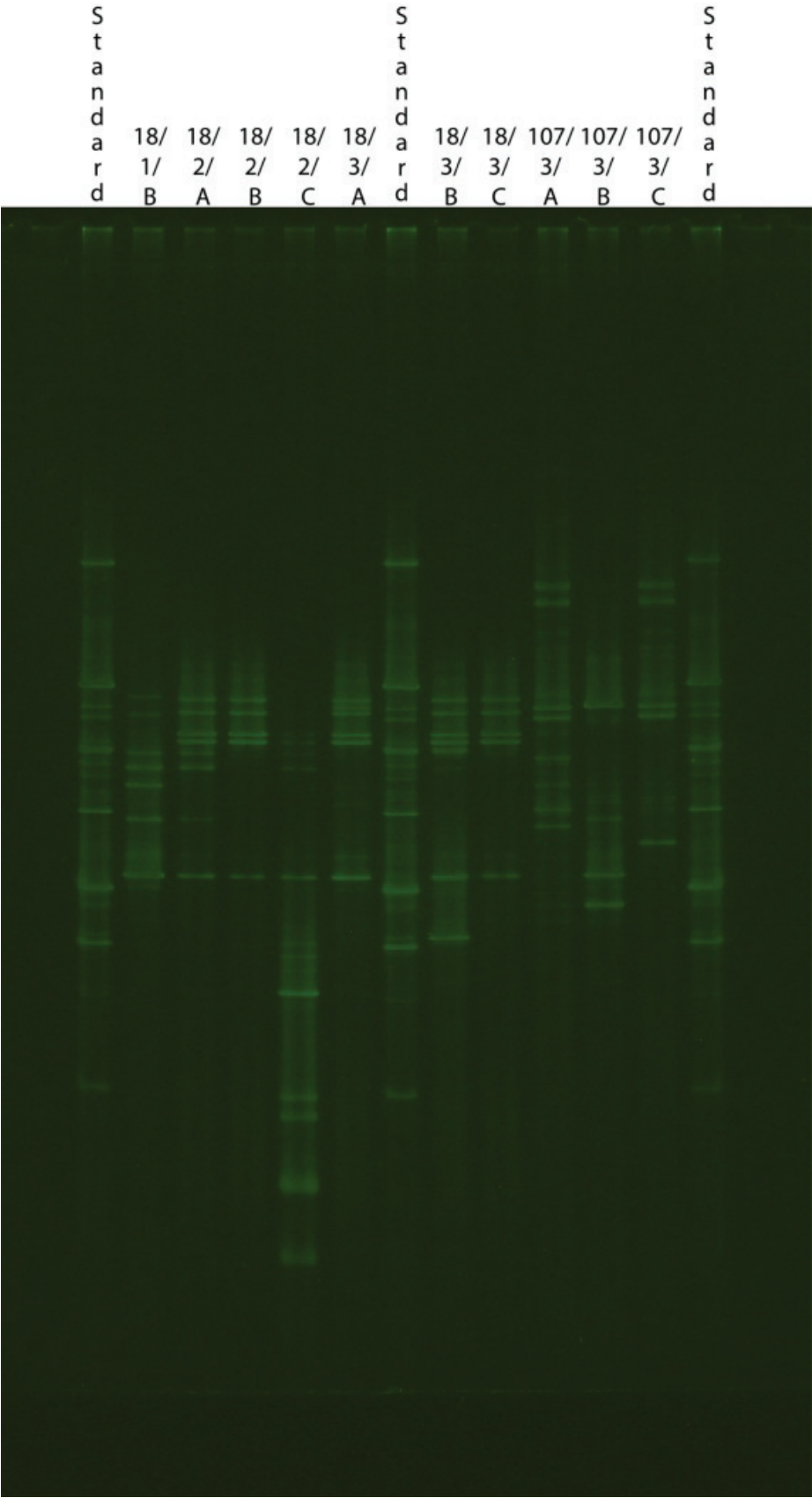


Stopnja
razgradnje
3,
gel A

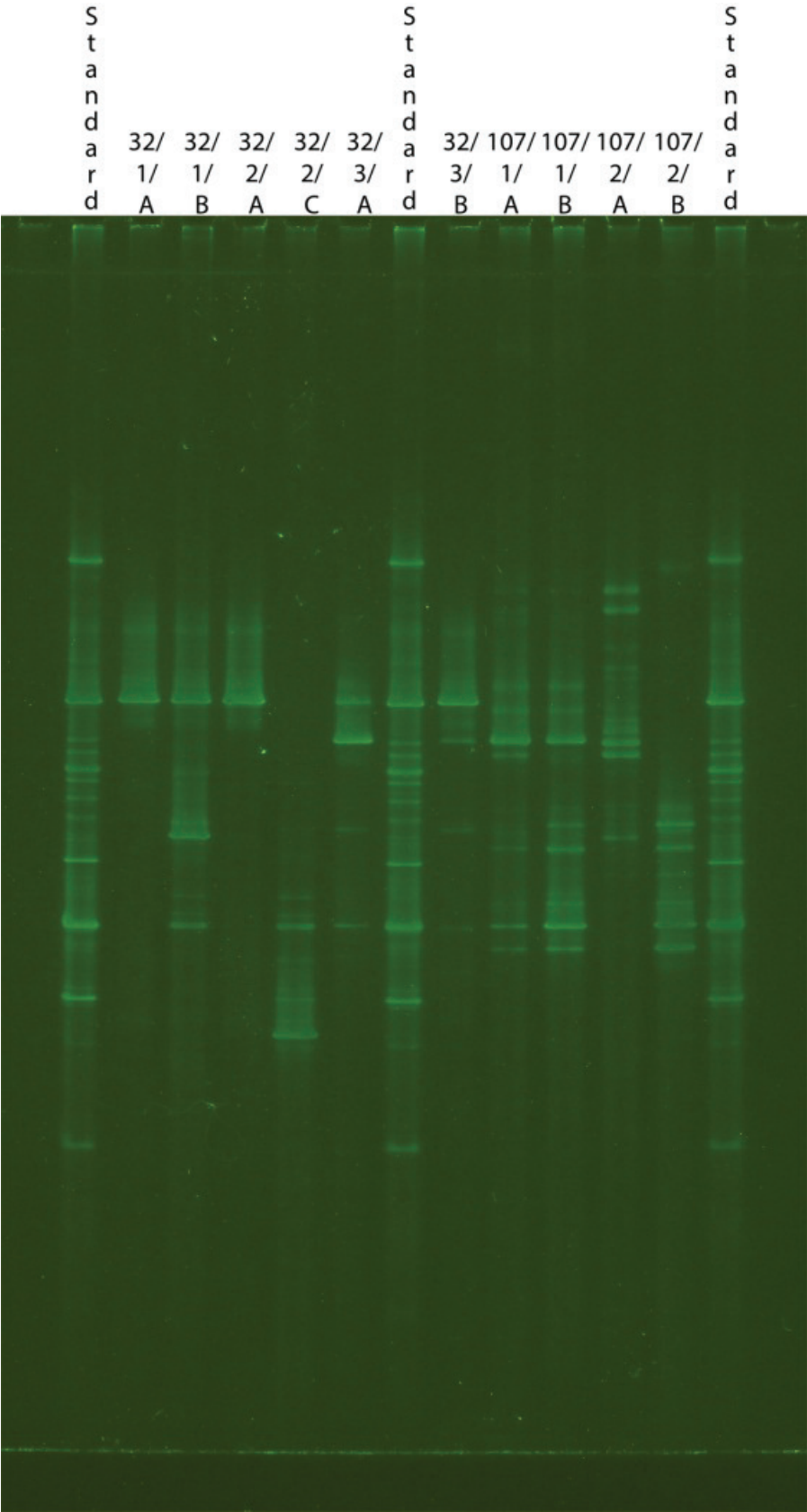


Stopnja
razgradnje
3,
gel B





Stopnja
razgradnje
5,
gel A



Stopnja razgradnje
5,
gel B