

GDK: 161.38:232.41:176.1 *Fagus sylvatica* L.(045)=163.6

Prispelo / Received: 01.02.2011

Sprejeto / Accepted: 18.06.2011

Izvirni znanstveni članek

Original scientific paper

Tipi ektomikorize pri sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) v rizotronih

Ines Štraus¹, Marko Bajc², Tine Grebenc³, Boštjan Mali⁴, Hojka Kraigher⁵

Izvleček

Naravni procesi ali dejavnost človeka vplivajo na razmere v okolju, kar se zrcali v sestavi ektomikoriznih združb. V raziskavi smo želeli ugotavljati morebitne vplive več temperaturnih režimov zraka in tal (substrata) na pojavljanje in vrstno pestrost tipov ektomikorize na koreninskih vršičkih sadik bukve in v substratu. V ta namen smo analizirali pojavljanje tipov ektomikorize na sadikah bukve v rizotronih, izpostavljenih štirim temperaturnim razmeram v okolju: 1.) zrak 15-25 °C; 2.) zrak 15-25 °C v kombinaciji s hlajenim koreninskim sistemom za 5 °C; 3.) povišana temperatura zraka od 30-50 °C in 4.) zunanja (ambientalna) temperatura zraka v Ljubljani. Tipe ektomikorize smo identificirali s kombiniranim pristopom po anatomsko morfoloških znakih in z analizo molekularnih markerjev (ITS1-5.8S rDNK-ITS2 ribosomalna regija v rDNK). Na 51 koreninskih vršičkih 40 sadik smo identificirali 6 tipov ektomikorize. Pestrost ektomikoriznih tipov je bila največja pri razmerah blizu optimalnih za rast bukve. Po vrstni sestavi združbe ektomikoriznih gliv sta si najbolj podobna poskusa s temperaturo zraka 15-25 °C z ali brez hlajenja koreninskega sistema. Najpogostejša ektomikorizna vrsta je bila *Hebeloma sacchariolens*, ki je bila tudi najpogosteje opažena vrsta na drobnih koreninah odmrlih sadik. Izbrane vrste ektomikoriznih gliv smo z metodo DGGE dokazali tudi v vseh analiziranih vzorcih substrata.

Ključne besede: sadike bukve, ektomikoriza, temperatura zraka in substrata, anatomsko morfološka identifikacija, molekularni markerji, filogenija

*Types of ectomycorrhizae on beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.) in rhizotrons*

Abstract

Natural processes or human activities affect environmental conditions, as reflected in the structure of the communities and the level of ectomycorrhizal fungi. The aim of the study was to determine the potential impacts of several temperature regimes of air and soil (substrate) on the occurrence and species diversity of ectomycorrhizal fungi in symbiosis and in the substrate. For this purpose, we analyzed the occurrence of types of ectomycorrhizae on beech seedlings in rhizotrons exposed to four different environmental temperature conditions: 1) air 15-25°C, 2) air 15-25°C in combination with cooling of roots for 5°C, 3) elevated air temperature from 30-50°C, and 4) ambient conditions (air temperature in Ljubljana). Types of ectomycorrhizae were identified with a combined approach of anatomical morphological characterisation and with analysis of molecular markers (ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ribosomal region in rDNA). We identified a total of 6 types of ectomycorrhizae on 51 root tips on 40 beech seedlings. The diversity of ectomycorrhizal types was the highest in terms of near-optimal growth conditions of beech. Most similar as far as species diversity of ectomycorrhizal fungi are concerned were the experiments with air temperature of 15-25°C with or without cooling of the root system. The commonest ectomycorrhizal species was *Hebeloma sacchariolens*, which was also the most commonly seen species in fine roots of dead plants. Selected species of ectomycorrhizal fungi were further substantiated with DGGE method in all analyzed substrate samples.

Key words: European beech seedlings, ectomycorrhiza, air and soil temperatures, anatomical morphological identification, molecular markers, phylogeny

¹ I.Š., univ. dipl. biol.; Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana; ines.straus@gozdis.si

² M.B., univ. dipl. mikrobiol.; Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana; marko.bajc@gozdis.si

³ dr. T.G., univ. dipl. biol.; Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana; tine.grebenc@gozdis.si

⁴ B.M., univ. dipl. ing. gozd; Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana; bostjan.mali@gozdis.si

⁵ prof. dr. H.K., univ. dipl. biol., univ. dipl. ing. gozd; Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana

1 Introduction

1 Uvod

Človekova dejavnost in naravne spremembe v okolju vplivajo na razvoj koreninskih vršičkov in s tem na razvoj ektomikorize, zato je ektomikoriza (ECM) lahko kazalec sprememb v okolju (KRAIGHER *et al.* 1996, CUDLIN *et al.* 2007). Funkcionalna kompatibilnost in toleranca na stres je pri ektomikoriznih tipih vrstno specifična (GIANINAZZI-PEARSON 1984), na podlagi tega smo z analizami sestave združbe ektomikorize že uspešno uporabili izbrane vrste kot bioindikatorje onesnaženosti v gozdnih tleh (KRAIGHER *et al.* 1996, KRAIGHER *et al.* 2007).

COURTY s sodelavci (2010) poroča o spremenjenih funkcijah ektomikoriznih gliv zaradi podnebnih sprememb. Poudarja dva dejavnika, ki vplivata na ektomikorizo: posredni vpliv na glivnega simbionta prek gostiteljske rastline (dvig atmosferskega CO₂ in segrevanje ozračja) zaradi spremenjenega razporejanja ogljika iz rastlin in neposreden vpliv na simbiotske glive zaradi segrevanja okolja in sprememb v dostopnosti vode.

Namen študije je ugotoviti pojavljanje in pestrost združbe ektomikoriznih gliv na sadikah bukve v rizotronih pri različnih temperaturnih režimih zraka in substrata. Predvidevali smo, da: i) se pri sadikah bukve, izpostavljenih različnim temperaturnim režimom, pojavljajo različni tipi ektomikorize; ii) bo pestrost ektomikorize največja pri sadikah bukve, rastočih v optimalnih temperaturnih razmerah za rast (zrak 15-20 °C); iii) dodatno hlajenje koreninskega sistema za 4-5 °C vpliva na sestavo združbe in pestrost ektomikorize vitalnih sadik bukve; iv) bo pestrost ECM pri vitalnih sadikah bukve večja kot pri sadikah, odmrlih med poskusom poskusa; in v) bomo identificirali ektomikorizne glive tudi v substratu, v katerem so posajene sadike bukve z mikoriznimi koreninskimi vršički.

2 Material in metode

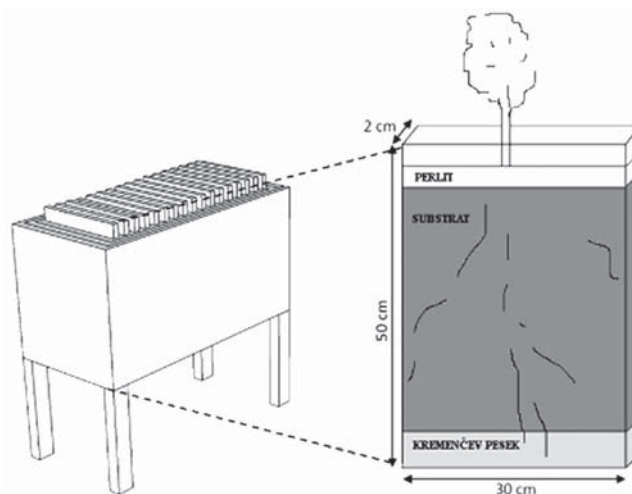
2 Material and methods

2.1 Bukov poskus v rizotronih

2.1 The beech trial in rhizotrons

Puljenke bukve (*Fagus sylvatica* L.) provenience Temenjaka (Preška), nabrane maja 2007, vzgojna oblika P1 (vodene kot puljenke +1), iz slovenskega predalpskega provenienčnega območja (GSO 4.0175), smo dobili iz Drevesnice Omorika, Muta. Velikost puljenk ob sadnji je bila od 30 do 50 cm, v času rasti so bile povprečne letne temperature 9,5 °C (l. 2007 in 2008) in 11,7 °C (2009) (SURs 2010). Spomladi 2009 smo sadike posadili v

steklene rizotrone (slika 1), dimenzij 30 cm x 50 cm x 2 cm. V rizotronu si od dna navzgor sledijo drenaža (kremenčev pesek) ca 5 cm, substrat ca 30 cm in perlit ca 2 cm. Substrat sestavljata 2/3 zemlje, dobljene na vrtu Gozdarskega inštituta Slovenije, in 1/3 vermikulita, ki je zagotovil boljše zračenje v predelu korenin in zadrževanja vlage. Substrat smo pred sajenjem presejali in pasterizirali pri 80 °C 3 ure. Skupno smo posadili 72 sadik bukve, tako da smo v vsak rizotron posadili po eno.



Slika 1. Skica rizotrona dimenzij 2 x 50 x 30 cm

Figure 1: Sketch of rhizotron measuring 2 x 50 x 30 cm

Po 18 sadik bukve na varianto smo od 8. 5. 2009 do 17. 11. 2009 gojili kontrolirano v štirih različnih temperaturnih razmerah: 1.) v hladni sobi pri temperaturi okolja 15-20 °C (poskus 1); 2.) v hladni sobi pri temperaturi okolja 15-20 °C z dodatnim hlajenjem rizotronov v predelu koreninskega sistema za 5 °C ± 1 °C pod temperaturo okolja (poskus 2); 3.) v rastlinjaku, kjer temperature zraka poleti dosežejo 30 do 50 °C, brez hlajenja v predelu korenin (poskus 3); 4.) v polsenčni legi na vrtu GIS, na zunanji (ambientalni) temperaturi zraka (poskus 4). Temperature zraka v hladni sobi (poskusa 1 in 2) in v rastlinjaku (poskus 3) smo v času poskusa merili z avtomatskim merilcem Voltcraft® DL-120 TH. Za podatke o zunanji temperaturi zraka smo uporabili povprečne letne temperature zraka v Ljubljani (SURs 15. 4. 2010, ARSO 26. 10. 2010).

Pri poskusih 1 in 2 v hladni sobi je bil dnevno-nočni ritem samodejno reguliran, sledil je letnemu času (postopno krajšanje oziroma daljšanje časa osvetljevanja glede na dejanski svetlobni režim med letom). Sadike iz obeh poskusov so bile izpostavljene umetni svetlobi (90 ± 5 μmol m⁻²s⁻¹). Sadike v poskusih 3 in 4 so bile izpostavljene naravnemu dnevno-nočnemu ritmu oziroma naravni dnevni svetlobi (50 ± 3 μmol m⁻²s⁻¹ v poskusu 3 in 120 ± 20 μmol m⁻²s⁻¹ v poskusu 4). Meritve svetlobe je

opravi dr. Matjaž Čater (GIS) dne 9. 6. 2010 s kvantnim PAR tipalom LICOR 190 SR.

V vseh poskusih smo sadike zalivali z avtomatskim kapljičnim načinom na površini rizotrona. V času vegetacijske sezone smo sadike zalivali 3-krat tedensko (ponedeljek, sredo in petek) s po 1,5 dl destilirane vode brez dodanih gnojil na rizotron. Vlage v substratu nismo merili.

2.2 Identifikacija ektomikorize

2.2 Identification of ectomycorrhiza

Tip ektomikorize smo analizirali z anatomsko-morfološko identifikacijo tipov ECM po AGERER (1987-2008) ter v kombinaciji s sekvenciranjem in filogenetsko primerjavo molekularnih markerjev. Analizirali smo dele koreninskih sistemov vitalnih sadik in sadik, ki so med poskusom kazale znake odmiranja oziroma so odmrle. ECM vitalnih in odmrlih sadik smo v analizah obravnavali ločeno. Če smo na korenini zaznali ECM, smo ta del korenine odrezali in ga shranili v petrijevki z vodo. Korenine smo vzorčili novembra in decembra 2009.

Anatomske in morfološke lastnosti smo opisovali po metodologiji AGERER (1991) in identificirali na podlagi objavljenih opisov tipov ECM (AGERER 1987-2008) ter s pomočjo interaktivne različice določevalnega ključa DEEMY (AGERER / RAMBOLD 2004 - 2010). Tipe ECM smo opazovali s stereo lupo (Olympus SZX12, povečava 7.5-64x; vir svetlobe Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlobo) in mikroskopom (Olympus, BX51, povečava 100-2000x). Izbrane tipe ektomikorize in anatomske preparate smo digitalizirali z digitalno kamero DP12-Olympus in slike analizirali s programom NIS - Elements© BR 3.0.

Z molekularnimi metodami smo analizirali ITS rDNK v jedrni regiji genoma višjih gliv. DNK gliv smo ekstrahirali s predpripravljenim sistemom za ekstrakcijo DNK (DNeasy Plant Mini Kit, Quiagen, Nemčija), dopolnjenim z navodili za ekstrakcijo DNK po SOP LABFIGE GIS (GREBENC / KRAIGHER 2005). DNK smo pomnoževali v verižni reakciji s polimerazo (PCR) z uporabo začetnih oligonukleotidov ITS1 ali ITS1f v kombinaciji z ITS4 (WHITE *et al.* 1990, GARDES / BRUNS 1993). Uspešnost PCR smo preverjali na agaroznem gelu, iz katerega smo tudi izrezovali proge pomnožkov (fragmente DNK) ustreznih dolžin, jih osamili s kompletom za spiranje nukleinskih kislin iz agaroznega gela (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, PROMEGA, ZDA) in pripravili za sekvenciranje. Pri vzorcih, kjer smo na agaroznem gelu dobili več kot eno progo, smo izrezane proge očistili in posamezne proge ponovno pomnožili (reamplificirali). Vzorce DNK za sekvenciranje smo poslali v komercialni sekvenčni laboratorij (Macrogen Inc., Seul, Republika

Koreja). Dobljene kromatograme po sekvenciranju smo analizirali s programom FinchTV 1.4 (Geospiza Inc., ZDA). Tako dobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v spletni bazi podatkov GenBank (NCBI 18. 3. 2010) in UNITE (ABARENKOV *et al.* 2010) s programom "BLASTn" (BLAST 2010). Urejene sekvence izbranih PCR-pomnožkov smo med seboj primerjali s programom MEGA 4.0 (TAMURA *et al.* 2007) in MAFFT (KATOH *et al.* 2009).

Filogenetske odnose smo ugotavljali z metodo največjega verjetja (»maximum likelihood«) (GUINDON / GASCUEL 2003). S programom jModelTest 0.1.1 smo poiskali najoptimalnejši model nukleotidnih zamenjav glede na popravljeni Akaikejev kriterij informativnosti (AICc) (POSADA 2008). Izbrani model smo uporabili za izdelavo filogenetskih dreves po metodi BioNJ (neighbor-joining) (GASCUEL 1997) s programom PAUP 4.0B10. Statistične podpore posameznih razvejitev smo izračunali z neparametričnim testom vezanja (»bootstrap«) (FELSENSTEIN 1985) s 2000 ponovitvami.

Podatke o pojavljanju tipov ECM na sadikah bukve smo uredili v programu Microsoft Office Excel 2007.

2.3 Pestrost ektomikorize v rastnem substratu

2.3 Diversity of ectomycorrhiza in substrates

Pojavljanje in pestrost gliv v rastnem substratu v kasetah smo analizirali s pristopom DGGE (gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu). Vzorce substrata smo odvzeli iz naključno izbranih kaset s pomočjo plastičnega tulca, premera 1 cm in dolžine 20 cm, v približnem volumnu 15 ml. Vsak vzorec posebej smo posušili v sterilizatorju St-06 (Instrumentaria, Zagreb), homogenizirali s pomočjo sterilnih kovinskih krogel na stresalniku Vibromix 104 EV (Tehtnica, Slovenija) in ekstrahirali celotno DNK iz substrata s predpripravljenim sistemom Power Soil DNK Isolation Kit (MO BIO, Kanada). DNK za analizo v DGGE smo pomnoževali v PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ITS 1-gc (GARDES / BRUNS 1993) in ITS 2 (<http://mollie.berkeley.edu/~bruns/tour/primers.html>). Za referenčne vzorce smo uporabili izbrane tipe ECM z analiziranih bukvic (*Tuber* sp., *Peziza* sp. in *Scleroderma* sp.), ki smo jih uporabili kot notranje standarde ločevanja v DGGE (preglednica 1). Vse pomnožke iz substrata smo ločevali z DCodeTM System elektroforezo (Bio-Rad, ZDA). Elektroforeza je tekla 16 ur v 8-odstotnem poliakrilamidnem gelu (akrilamid/bisakrilamid 37,5:1) z 1-krat TAE (Tris – očetna kislina) pufrom pri 60 °C in 75 V. Denaturacijski gradient je bil 25 % (1.75M urea, 10 % formamid) – 60 % (4.2M urea, 24 % formamid). Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 minut z barvilom SYBR Gold (SYBR® Gold nucleic acid gel stain, Invitrogen, USA). Po barvanju smo gele spirali 1 minuto v 1x TAE pufru in jih pregledovali v

Preglednica 1: Tipi ektomikorize in oznaka substratov, ki smo jih uporabili v analizi DGGE

Table 1: Types of ECM and substrate labels used in DGGE analysis

Oznaka analiziranega substrata / Code of analyzed substrate	Oznaka sadike / Code of seedling	Referenčni vzorci vrst ECM-gliv / Reference samples of ECM fungi	Številka in oznaka vzorca / Number and code of sample
S1	BU30	<i>Tuber</i> sp.	Vzorec 11 (SLO_IS_011_BU30_S)
S2	BU7		Vzorec 12 (SLO_IS_012_BU7_S)
	BU7		Vzorec 7A (SLO_IS_012_BU7_S)
S3	BU107	<i>Peziza</i> sp.	Vzorec 13 (SLO_IS_013_BU107_S)
	BU112		Vzorec 4A (SLO_IS_006_BU112_S)
S4	BU109	<i>Scleroderma</i> sp.	Vzorec 14 (SLO_IS_014_BU109_S)

transiluminatorju Gel Doc EQ System, PC (Bio-Rad, Italy) pod UV lučjo (302 nm). Za slikanje smo uporabili digitalni fotoaparati EOS 500D (Canon, Japonska) in na slikah primerjali in odčitali ogovarjajoče fragmente izbranih tipov ECM in pomnoške neznanih gliv v vzorcih substrata.

3 Rezultati

3 Results

3.1 Opisi tipov ektomikorize

3.1 Description of types of ecm

V celotnem poskusu (po 18 sadik v štirih različnih temperaturnih režimih) smo identificirali tipe ECM na 51 koreninskih vršičkih, ki so se pojavljali na 40 sadikah bukve od skupaj 72 sadik. Do jeseni je v rizotronih preživel 24 sadik, posušilo se jih je 48. Na vseh analiziranih sadikah smo z anatomsko-morfološko metodo opisali osem različnih tipov ektomikorize, ki smo jih identificirali s kombinacijo anatomsko morfoloških in molekularnih pristopov (preglednica 2).

3.2 Identifikacija tipov ecm z molekularnimi pristopi

3.2 Molecular identification of ecm

Izmed osmih tipov ECM, opisanih po anatomsko morfološki metodi, smo jih z analizo sekvenc (molekularno analizo) identificirali šest, pet do vrste in eno do rodu. Za izbrane vzorce ECM smo z namenom identifikacije glive v mikorizi analizirali rDNK v jedrni regiji, tako da smo s primerjavo sekvenc z dostopnimi bazami podatkov ločili ECM vrste od naključnih okužb in okvirno identificirali ECM (preglednica 2). Za vrste iz rodu *Peziza* (slika 2), *Scleroderma* (slika 3) *Leptodontidium* (slika 4) in *Tuber* (slika 5) smo izdelali podrobna drevesa filogenetske sorodnosti z razpoložljivimi nukleotidnimi zaporedji iz baz podatkov (številke javnih zaporedij so navedene v posameznem filogenetskem drevesu) in natančno umestili neznane tipe ECM ter dobili ali potrdili pravilnost identifikacije ECM.



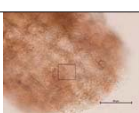
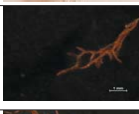




3.3 Pojavljanje tipov ektomikorize

3.3 Occurrence of ectomycorrhiza types

Največ koreninskih vršičkov z razvito mikorizo smo identificirali v poskusu 2 (31,4 %), nato v poskusih 1 in 3 (23,5 %), najmanj pa v poskusu 4 (21,6 %) (slika 6).

Preglednica 2: Oznake, opisi in identifikacija tipov ECM, najdenih na sadikah bukve v rizotronih

Table 2: Identification code, descriptions and identification of ECM types of beech seedlings grown in rhizotrons, identified after anatomical and morphological characteristics (AGERER 1987-2008)

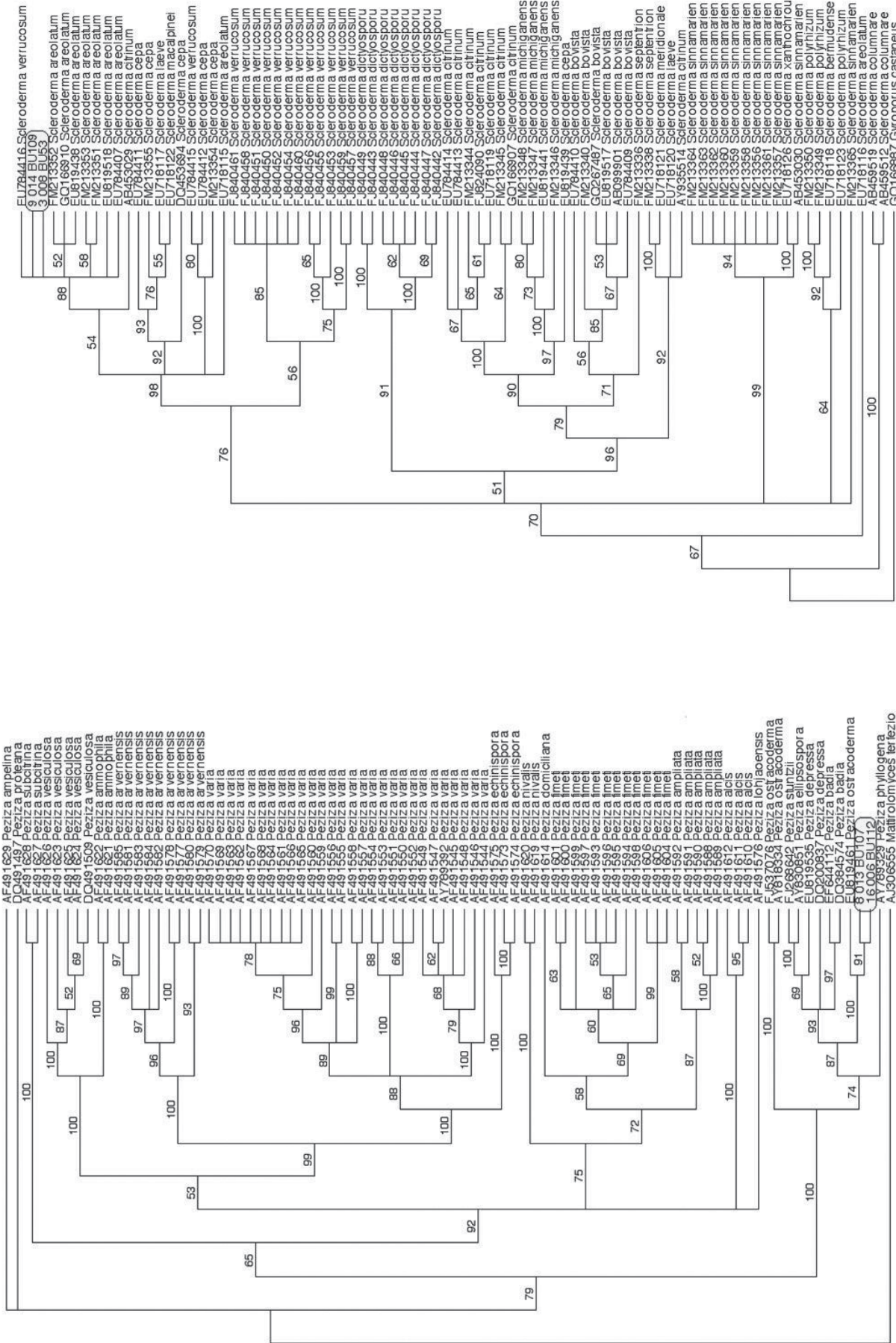
Tip in anatomsko-morfološka identifikacija / Type and identification after morphology	Razraščanje in oblika / Ramification and growth	Površina in obarvanost plašča / Surface and colour of the mantle	Izhajajoči elementi / Emanating elements	Anatomija plašča (po Agerer, 1987-2008) / Mantle anatomy (after Agerer, 1987-2008) (zunanji plašč / notranji plašč) / (outer mantle / inner mantle)	Anatomija i) izhajajočih elementov in ii) rizomorfov / Anatomy of i) emanating elements and ii) rhizomorphs	Barvanja / Colour reactions	Identifikacija z molekularnimi metodami in filogenijo / Identification with molecular methods and phylogeny	Slika / Figure
SLO_IS_001_BU64_S	Enostavna, kroglaste oblike	Gladka, sijoča, bele barve	Nismo opazili	Nismo analizirali	i) Nismo opazili ii) Nismo opazili	/	<i>Hebeloma sacchariolen</i> Quel.	
SLO_IS_003_BU60_S (<i>Cenococcum geophilum</i> Fr.)	Enostavna, ravna	Groba, temno rjave barve, tudi črne, apeks enake barve	Hife	Zvezdasti (tip G) po AGERER (1987-2008)	i) Hife številne, pogostejše v zgornji tretjini ECM, kjer izraščajo pravokotno na ECM ii) Nismo opazili	/	<i>Cenococcum geophilum</i> Fr.	
SLO_IS_005_BU94_S	Enostavna, ukrivljena	Groba, s posameznimi skupki substrata, ki dajejo svetlikajoč videz, oker do rjave barve	Nismo opazili	Plektenhimatski (tip E) po AGERER (1987-2008)	i) Nismo opazili ii) Nismo opazili	/	<i>Hypocreales</i> sp.	
SLO_IS_006_BU112_S	Enostavna, ravna do ukrivljena	Groba, svetlikajoča zaradi delecev substrata na površini, rjave barve, apeks enake barve ali nekoliko temnejši	Nismo opazili	Plektenhimatski (tip E) po AGERER (1987-2008), s posameznimi kratkimi segmenti	i) Nismo opazili ii) Nismo opazili	/	<i>Peziza ostracoderma</i> Korf.	
SLO_IS_007_BU112_S	Nepravilno pinatno, ukrivljena	Groba, nagubana, z delci substrata, oker rjava, apeks temno rjav	Nismo opazili	Prehoden tip med tipom H in L po AGERER (1987-2008)	i) Nismo opazili ii) Nismo opazili	/	<i>Leptodontidium orchidicola</i> Sigler & Currah	
SLO_IS_011_BU30_S (<i>Tuber</i> sp. 1)	Enostavna, ravna do nekoliko ukrivljena	Gladka, svetlikajoča, iz nje ježasto izraščajo cistide, barva površine je oker do svetlo rjava, lahko obstajajo rjave pege, apeks svetlejša barve	Cistide	Pseudoparenhimatski, hife oblikujejo mrežo, iz katere izraščajo cistide (tip D) / pseudoparenhimatski z epidermoidnimi celicami (tip M) po AGERER (1987-2008)	i) Ježasto izraščajo iz plašča, so brezbarvne, tip A po AGERER (1987-2008) ii) Nismo opazili	/	<i>Tuber</i> sp.	
SLO_IS_013_BU107_S	Enostavna, ravna do rahlo ukrivljena	Gladka, lahko tudi groba, svetlikajoča, rjava ali oker, po površini rjave pege, apeks enake barve	Nismo opazili	Pseudoparenhimatski (tip L) / pseudoparenhimatski, prehodni tip med tipom L in M po AGERER (1987-2008)	i) Nismo opazili ii) Nismo opazili	Sulfovanilin – ni reakcije	<i>Peziza ostracoderma</i> Korf.	
SLO_IS_008_BU53_S	Enostavna, rahlo do izrazito ukrivljena, nalomljena	Gladka, bleščeča, belo srebrne barve stari deli oker rumene barve, apeks svetlo rumen	Hife, rizomorfi	Plektenhimatski (tip E) / plektenhimatski, hife imajo značilno krožno razporeditev (tip A) po AGERER (1987-2008)	i) Hife pogoste, nimajo zaponk, povezave med hifami tipa b ₂ po AGERER (1987-2008), posamezne zožitve hif, pred razvejitvami je celična stena odebeljena, doliporne septe, dva tipa hif: granulirane in gladke, pojavljajo se posamezne cistide tipa N po AGERER (1987-2008) ii) Pogosti, diferencirani, v sredini odebeljene hife, ravne, obdajajo jih tanjše hife, tip F po AGERER (1987-2008)	/	<i>Scleroderma areolatum</i> Ehrenb.	

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

3.4 Pojavljanje tipov ECM pri vitalnih in odmrlih sadikah bukve

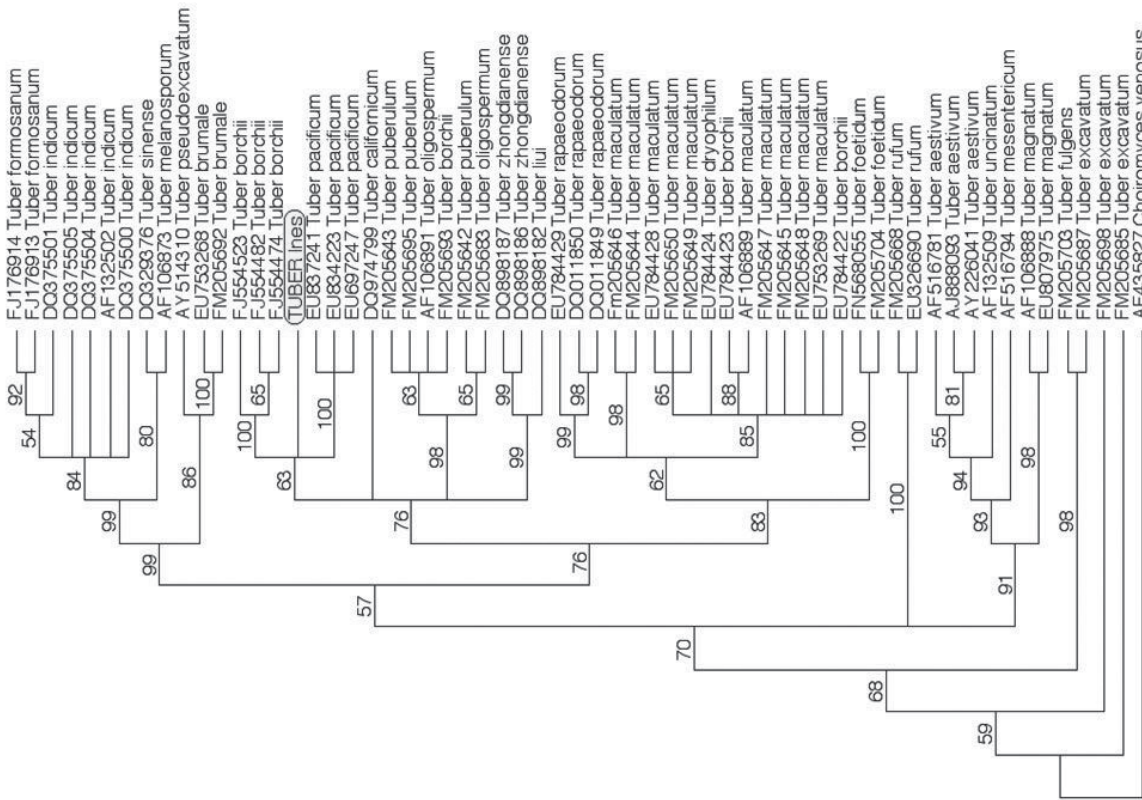
3.4 The occurrence of ECM types on vital and dead beech seedlings

Pri sadikah bukve smo naredili primerjavo deleža mikoriznih in nemikoriznih koreninskih vršičkov na vitalnih in odmrlih sadikah, za vsak poskus posebej. Na koreninskih vršičkih vitalnih sadik smo ECM identificirali le v poskusih 1 in 2. V poskusu 1 je za 2 % več ECM



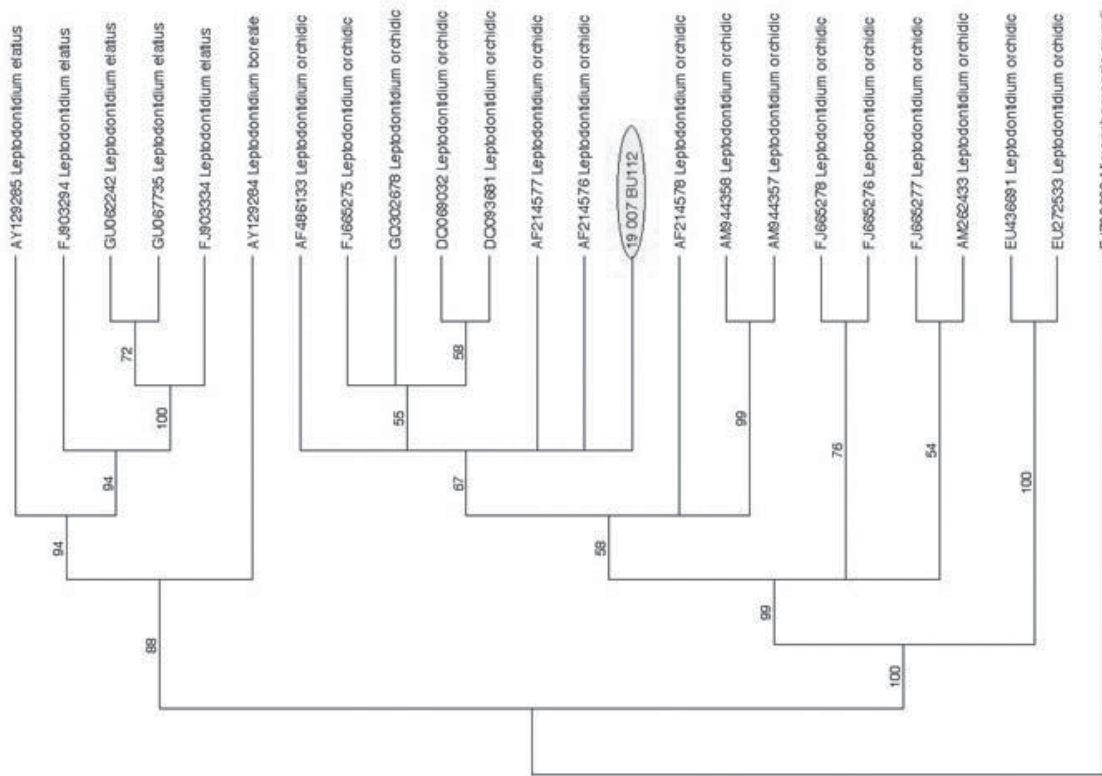
Slika 2: Konsenzno »bootstrap« filogenetsko drevo za rod *Peziza* (vzorca SLO_IS_006_BU112_S (16 006 BU112) in SLO_IS_013_BU107_S (8 013 BU107))
 Figure 2: Bootstrap consensus tree for the genus *Peziza* (samples SLO_IS_006_BU112_S (16 006 BU112) and SLO_IS_013_BU107_S (8 013 BU107))

Slika 3: Konsenzno »bootstrap« filogenetsko drevo za rod *Scleroderma* (vzorca SLO_IS_008_BU53_S (3 008 BU53) in SLO_IS_014_BU109_S (9 014 BU109))
 Figure 3: Bootstrap consensus tree for the genus *Scleroderma* (samples SLO_IS_008_BU53_S (3 008 BU53) and SLO_IS_014_BU109_S (9 014 BU109))



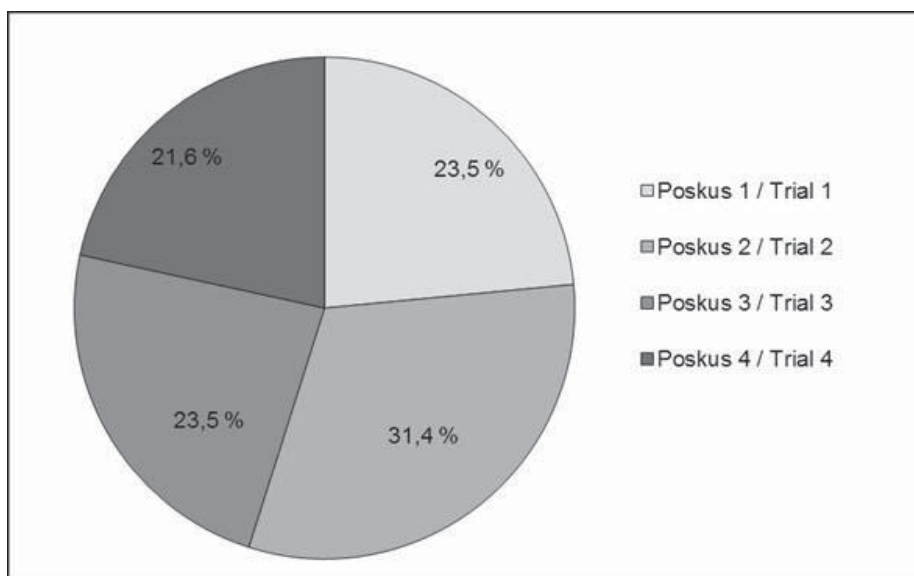
Slika 5: Konsenzno »bootstrap« filogenetsko drevo za rod *Tuber* (TUBER Ines)

Figure 5: Bootstrap consensus tree for the genus *Tuber* (TUBER Ines)



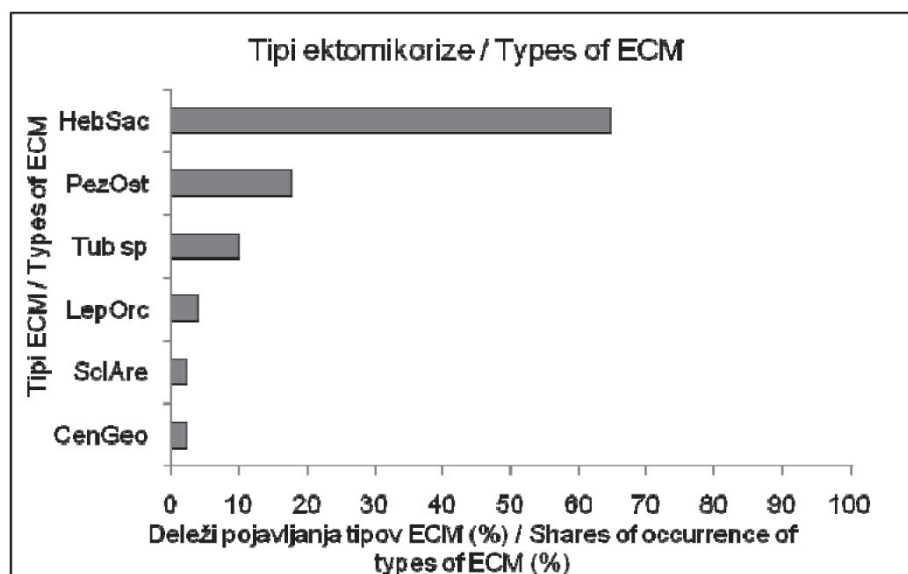
Slika 4: Konsenzno »bootstrap« filogenetsko drevo za rod *Leptodontidium* (vzorec SLO_IS_007_BU112_S (19 007 BU112))

Figure 4: Bootstrap consensus tree for the genus *Leptodontidium* (sample SLO_IS_007_BU112_S (19 007 BU112))



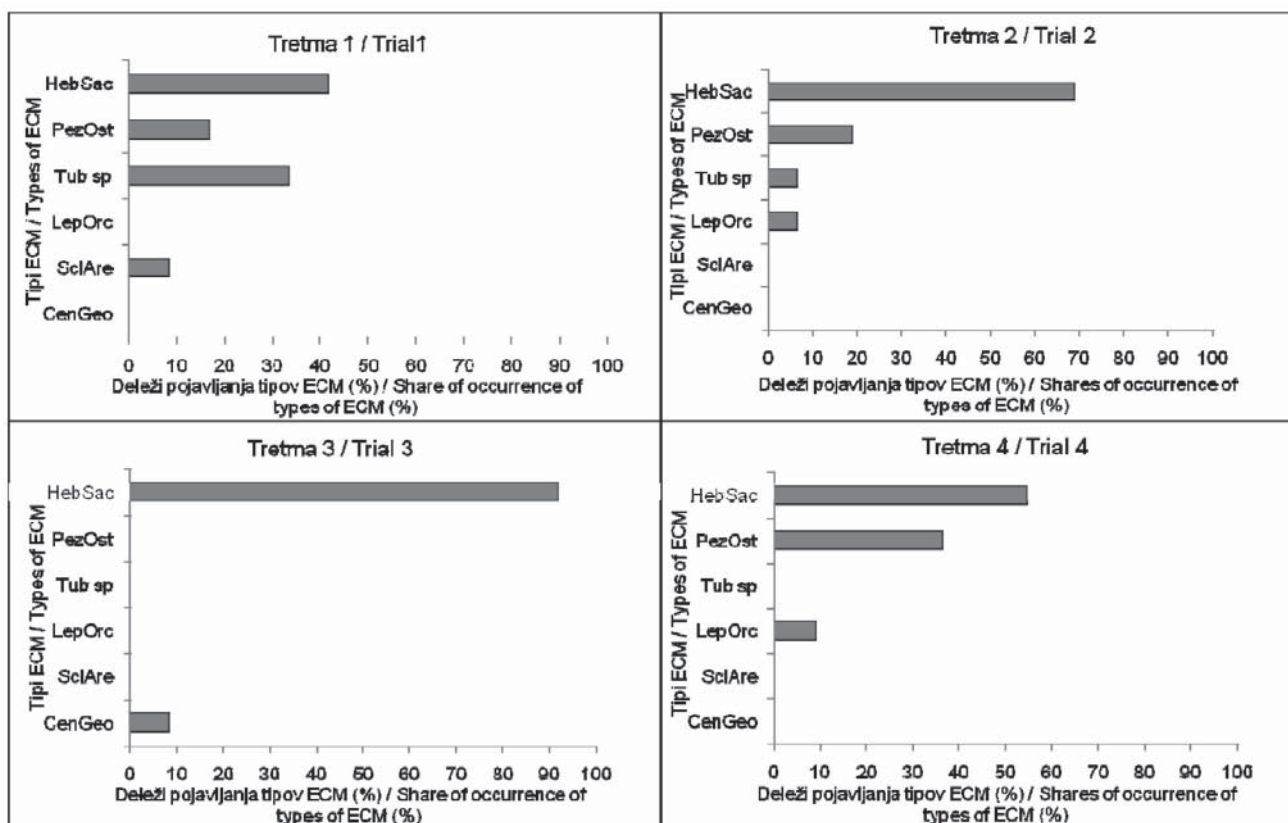
Slika 6: Delež ektomikoriznih kratkih korenin glede na pregledane koreninske vršičke sadik bukve v štirih različnih razmerah (poskusi 1, 2, 3 in 4)

Figure 6: Share of ectomycorrhizal short roots in relation to the examined root tips of beech seedlings at four different conditions (trials 1, 2, 3 and 4)



Slika 7: Deleži pojavljanja posameznih tipov ektomikorize na osnovi vsote vseh tipov ECM ($\Sigma = 51$), ki smo jih določili pri vitalnih in odmrlih sadikah. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*.

Figure 7: Shares of occurrence of single mycorrhiza types based on the sum of all types of ECM ($\Sigma = 51$), which had been defined in vital and dead seedlings. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*.



Slika 8: Deleži pojavljanja ektomikorize na sadikah bukve pri štirih različnih temperaturnih razmerah za rast. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*.

Figure 8: Shares of occurrence of mycorrhiza types on beech seedlings at three different temperature growth conditions. HebSac-*Hebeloma sacchariolens*. SclAre-*Scleroderma areolatum*. Tub sp.-*Tuber* sp. PezOst-*Peziza ostracoderma*. CenGeo-*Cenococcum geophilum*. LepOrc-*Leptodontidium orchidicola*.

vršičkov kot v poskusu 2, vendar moramo upoštevati, da je v poskusu 1 tudi več vitalnih sadik kot v poskusu 2 (slika 9). V poskusu 3 so vse sadike odmrle, zato tipov ECM na vitalnih sadikah ni bilo mogoče identificirati. V poskusu 4 je bilo 10 vitalnih sadik, vendar na nobeni od njih ni bilo vitalne ECM. Odstotke mikoriznih in nemikoriznih koreninskih vršičkov na vitalnih sadikah bukve smo prikazali na sliki 8. Pojavljanje mikoriznih in nemikoriznih tipov ECM smo na grafu predstavili tudi za odmrle sadike (slika 9).

3.5 Identifikacija ECM v vzorcu zemlje z metodo DGGE

3.5 Identification of ECM in the pattern of soil with DGGE method

Rezultati DGGE elektroforetske ločitve PCR-pomnožkov so pokazali, da je micelij ektomikoriznih gliv tudi v substratu in ne le na koreninskem sistemu sadik

(slika 10). V pomnožkih iz posameznih substratov smo poleg fragmentov, ki so ustrezali izbranim referenčnim glivam v ECM, opazili tudi več fragmentov drugih gliv (8-12), katerih identitete nismo ugotavljali. Fragmenti predvidoma ustrezajo drugim vrstam ECM ter drugim glivam v substratu.

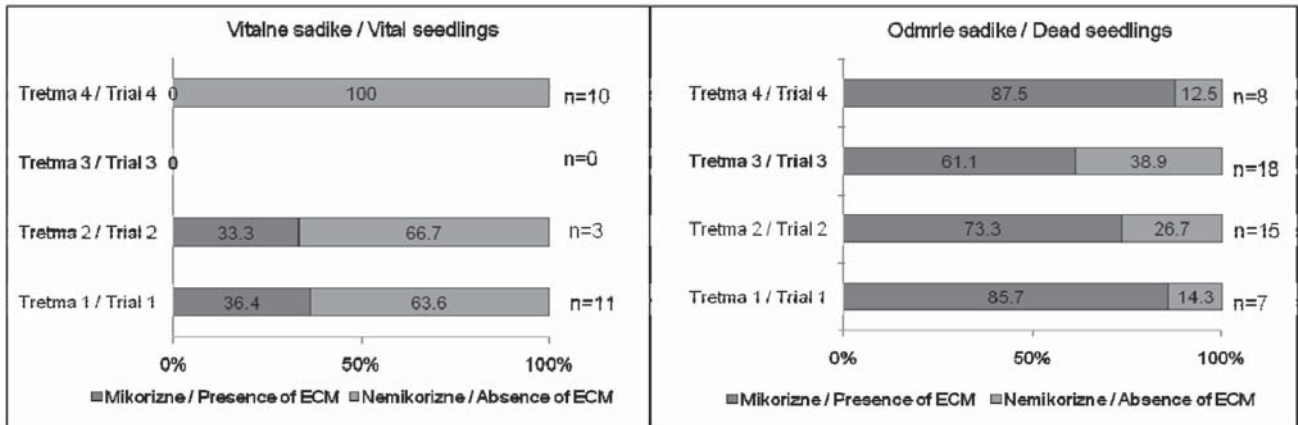
4 Diskusija

4 Discussion

4.1 Identifikacija tipov ektomikorize na sadikah bukve

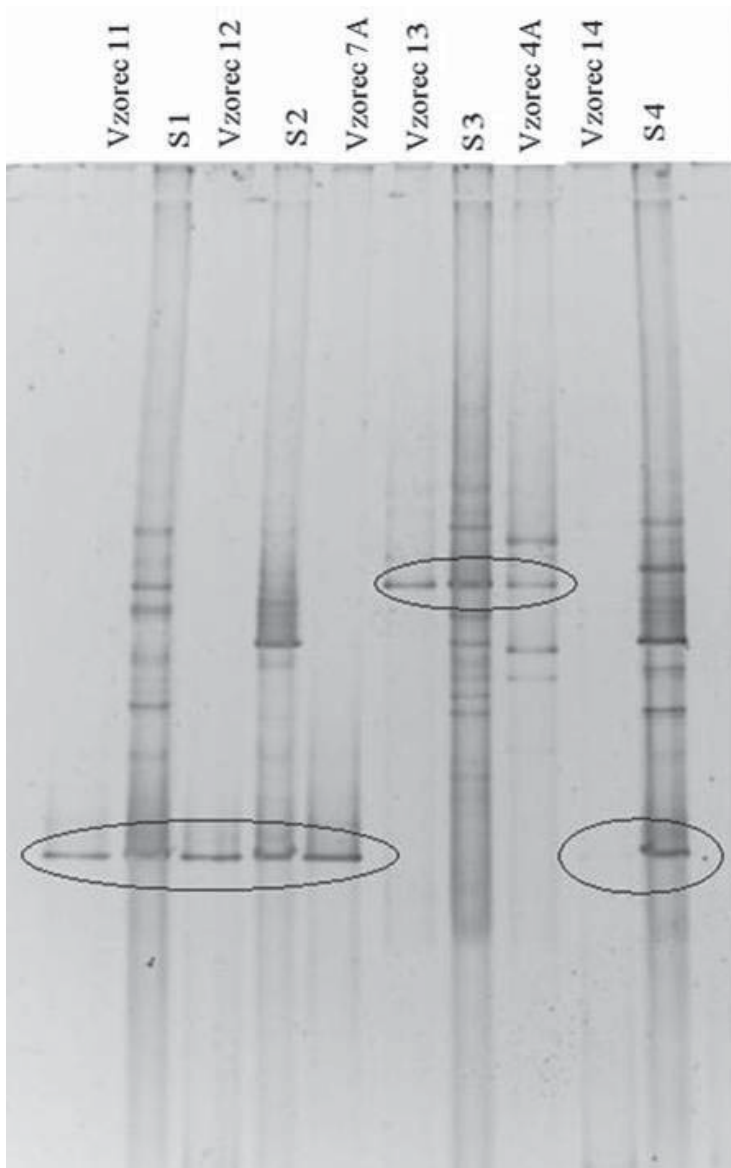
4.1 Identification of types of ecm on beech seedlings

Najbolj razširjena metoda za določevanje tipov ektomikorize je anatomsko-morfološka metoda, pri kateri tip ektomikorize določamo glede na morfološke,



Slika 9: Delež mikoriznih in ne-mikoriznih na vitalnih (levo) in odmrlih (desno) sadikah bukve in celotno število vitalnih (levo) in odmrlih (desno) sadik (n) v poskusu

Figure 9: Share of mycorrhizal and non-mycorrhizal vital beech seedlings (left) and dead (right) beech seedlings (n) in this experiment



Slika 10: DGGE-elektroforetska ločitev pomnožkov PCR iz izbranih vzorcev
Figure 10: DGGE electrophoretogramme of PCR amplicates of chosen samples

anatomske in kemijske znake (AGERER 1987–2008). Na osnovi anatomsko-morfoloških lastnosti, z ugotavljanjem pojavljanja trosnjakov ektomikorize, težko ugotavljamo populacijske strukture ektomikoriznih gliv (GREBENC 2005). Omenjene pristope lahko dopolnjujemo z molekularnimi tehnikami, ki omogočajo razmeroma hiter in od okoljskih razmer neodvisen pristop in identifikacijo tudi na velikem številu vzorcev v razmeroma kratkem času (EGGER 1995). Z molekularnimi metodami izkoriščamo informacije, ki jih nosi nukleotidno zaporedje v DNK. Sledenje in identifikacija glive na osnovi DNK-zaporedja je uporabno orodje, predvsem pri delu z vzorci iz okolja, ki ne pomenijo vedno čiste kulture, na primer vzorci mikorize iz zemlje. rDNK-regija v genomu gliv je pogosto uporabljana v sistematiki in pri ugotavljanju filogenetskih odnosov med skupinami gliv, a tudi v razvoju metod molekularne identifikacije in diagnostike, v medicini, kmetijstvu, gozdarstvu in splošno v ekologiji (BRIDGE 2002). Če primerjamo med seboj tipe ECM, ki smo jih določili z omenjenima metodama, smo do vrste pravilno in identično določili le en tip ECM, *C. geophilum*. Z anatomsko-morfološko metodo lahko do vrste določimo le manjši delež tipov ektomikorize (KRAIGHER *et al.* 1995; PÜTTSEPP *et al.* 2004), saj je metoda identifikacije subjektivna. Zato vzporedno z anatomsko-morfološko metodo po AGERER (1991) pogosto uporabljamo še molekularne metode oziroma pomnoževanje DNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (PENNANEN *et al.* 2001), ki ji sledi sekvenciranje in analiza sekvenc. Tehnika PCR ne omogoča le združevanja organizmov v posamezne skupine (grupiranje), temveč lahko rezultira v identifikaciji organizmov do vrste (KRAIGHER *et al.* 1995). Dejstvo je, da kombiniran pristop omogoča zanesljivejšo in točnejšo identifikacijo gliv v ECM, kar kažejo tudi naši rezultati, dobljeni z obema načinoma identifikacije. S pomočjo PCR-metode in sekvenciranja smo do vrste določili 5 tipov ektomikorize (*H. sacchariolens*, *P. ostracoderma*, *C. geophilum*, *S. areolatum* in *L. orchidicola*) in en tip do rodu (*Tuber* sp.).

Poleg omenjenih metod smo za identifikacijo ektomikoriznih tipov na sadikah bukve izdelali filogenetska drevesa na osnovi molekularne filogenetike (WHELAN *et al.* 2001), in sicer za vrste *L. orchidicola*, *P. ostracoderma*, *S. areolatum* in *Tuber* sp. Prav tako smo z izdelavo filogenetskih dreves poskušali določiti vrsto ECM iz rodu *Tuber* sp., kar pa nam z anatomsko-morfološko metodo in z molekularnimi metodami ni uspelo.

Vsa pomnožena zaporedja ECM v rizotronih iz rodu *Tuber* (sekvence 6, 7, 11 in 12) so identična. Iz tega sklepamo, da gre za isti tip ektomikorize, kljub opaženim razlikam na anatomsko-morfološkem nivoju. Za rod *Tuber* sp. smo izdelali filogenetsko drevo (slika 5), iz katerega ne moremo sklepati, za katero vrsto gre, saj vzorci tvorijo ločen 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 predstavljajo

neidentificirano skupino vzorcev blizu vrsti *T. pacificum*, ki geografsko izhajajo iz Severne Amerike (nukleotidna zaporedja z akcesijami FJ008030, DQ420631, EU563484, AY634174 in FJ807981) in Mehike (EU563484), ter večjo skupino neizoliranih vzorcev iz rodu *Tuber* z različnimi geografskimi porekli, blizu vrsti *T. borchii*. Možnih virov inokulumov za neznano ektomikorizo iz rodu *Tuber* v drevesnici je več, saj smo v neposredni bližini gredic, na katerih so rastle bukvice, pred izkopavanjem opazili več ektomikoriznih vrst (*Carpinus betulus*, *Quercus rubra*) in tujerodno vrsto, ki tvori arbuskularno mikorizo, *Juglans nigra*. Drevesa so bila sajena v letu 1963, njihov izvor pa ni znan (podatek Drevesnice Omorika). Ker gre za odrasla drevesa z dobro razvitim koreninskim sistemom, lahko sklepamo, da je prišlo do infekcije korenin bukvic tudi z inokulumom omenjenih dreves neznanega porekla.

Identičen pristop smo uporabili tudi za rodove na slikah 2-5. Za večino tipov ECM iz omenjenih rodov nam je na osnovi filogenetske analize uspelo umestiti vzorce v vrsto. Težavo smo imeli z vzorcem SLO_IS_008_BU53_S, za katerega smo s primerjavo sekvenc z bazami podatkov dobili dva rezultata, *S. areolatum* (EU819438.1) in *S. verrucosum* (EU784416.1). Obe vrsti imata zelo visok odstotek podobnosti (99 %) (SLO_IS_008_BU53_S), zato na osnovi teh podatkov ne moremo nedvoumno sklepati, kateri vrsti pripada omenjeni tip ECM. Visoko podobnost nukleotidnih zaporedij ITS-regije morfološko različnih vrst so opazili tudi pri mikoriznem rodu koprenk (*Cortinarius*), kjer so različne vrste med seboj lahko ločili šele s hkratno uporabo več molekularnih markerjev (PEINTNER *et al.* 2004). V našem primeru smo naknadno iz filogenetskega drevesa za rod *Scleroderma* (slika 3) razbrali, da se vzorec 9 (SLO_IS_008_BU53_S) v dendrogramu uvrsti v grozd sekvenc vrste *S. areolatum*. V skupini (grozdu) vrste *S. areolatum*, kamor se uvrstita tudi naša vzorca (9_014_BU109 in 3_008_BU53), je uvrščena tudi sekvenca EU784416, ki je klasificirana kot *S. verrucosum*. Ker večina sekvenc *S. verrucosum* in *S. areolatum* tvori jasno ločena in koherentna grozda, je možno, da so avtorji objave EU784416 napačno identificirali dotično glivo na osnovi morfološko-anatomskih kriterijev.

4.2 Pestrost tipov ektomikorize v različnih rastnih razmerah

4.2 Diversity of ectomycorrhiza types in different temperature regimes

Največkrat smo mikorizo identificirali v poskusu, kjer smo sadike bukev izpostavili temperaturi 15-20 °C in kjer smo predel korenin dodatno ohlajali (slika 6). EBERT (1996, cit. po GREBENC 2005) ugotavlja, da pri povprečni letni temperaturi 8 °C in več kot 800 mm padavin obstajajo optimalne razmere za produktivnost in vitalnost bukve. Optimalne razmere dobro vplivajo tudi na razvoj ektomikorize, kar smo dokazali pri poskusu 2

(15-20 °C z dodatnim hlajenjem korenin). Če oba partnerja v mikorizi živita v optimalnih razmerah, bo njun razvoj potekal hitreje in bo izmenjava snovi bolj učinkovita. Obstoj ektomikorize na koreninah sadik, katerih nadzemni deli so pred kratkim odmrli, lahko razlagamo s tem, da ektomikorizne glive, ki sicer živijo v simbiozi z drevesom, izkoristijo odmrle korenine kot vir hrane in se posledično vedejo kot saprofiti (MARTIN *et al.* 2008).

Med poskusi prihaja do razlik v številu kot tudi v vrstni sestavi ektomikoriznih gliv (slika 8). Po vrstni sestavi sta si najbolj podobna poskusa, ki smo ju izpostavili temperaturi 15-20 °C. Razlog je verjetno ta, da so razmere v obeh poskusih enake, če zanemarimo dodatno ohlajevanje koreninskega predela v enem izmed poskusov. Podobno vrstno sestavo ima tudi kontrolni poskus s tremi tipi ektomikorize. Najbolj se razlikuje poskus, kjer smo povišali temperaturo, saj je v tem primeru identificiran le en skupen tip ektomikorize (*H. sacchariolen*s). *C. geophilum* se je verjetno razvil v fazi, ko se je substrat zaradi previsokih temperatur okolice in premalo vode v substratu osušil, saj je zanj značilno, da se pogosto pojavlja predvsem v sušnih razmerah tal (LOBUGLIO 1999, PARADI / BAAR 2006, ŽELEZNIK *et al.* 2007).

Posamezni tipi ECM se v poskusih večkrat pojavijo. Največkrat smo identificirali tip *H. sacchariolen*s (slika 8), in sicer izključno le na koreninskih sistemih odmrlih sadik, kar je lahko posledica načina vzorčenja. Vrsta *H. sacchariolen*s je zelo heterogena (FLEMING 1985). Pojavlja se predvsem kot gliva mladih dreves (NORVELL / EXETER 2004) in specifičnega substrata (FLEMING 1985), kar potrjuje pogostost pojavljanja na sadikah bukve pri našem poskusu. V ekosistemu se lahko pojavlja kot potencialni saprofit in tako živi brez simbioze z rastlinami (MARMEISSE *et al.* 1999), kar potrjuje njen obstoj na odmrlih koreninskih sistemih v našem poskusu.

Vrsto *Leptodontidium orchidicola*, ki smo jo identificirali v poskusih 2 in 4, uvrščamo v skupino temnih septiranih endofitskih gliv (ang. dark-septate endophytic (DSE) fungi), za katere je značilno, da razvijejo simbiozo z rastlinami iz različnih družin, od tropskih do arktičnih oziroma z rastlinami, ki rastejo v stresnih habitatih (JUMPPONEN / TRAPPE 1998 cit. po WU / GUO 2008). Glive na gojišču ne razvijejo konidijev ali drugih razmnoževalnih struktur, s staranjem kolonije postanejo črne barve (DE HOOG 1977 cit. po WU / GUO 2008). Za *L. orchidicola* je značilno, da lahko z rastlinami razvije različne simbiotske interakcije, od mikoriznih do parazitskih, odvisno od razmer v okolju, ki jim je izpostavljena (WU / GUO 2008).

4.3 Identifikacija mikoriznih gliv v talnih substratih

4.3 Identification of mycorrhizal fungi in soil substrates

Poleg tega, da ektomikorizne glive preraščajo koreninske vršičke višjih rastlin (makrosimbionta), jih lahko izoliramo tudi iz substrata, v katerem je posajena sadika z razvito ektomikorizo. V substratu so namreč različni vegetativni in reproduktivni deli ektomikoriznih gliv (KIRK *et al.* 2008), kot so hife, rizomorfi in trosi. Z metodo DGGE smo za tri različne tipe ektomikorize (*Tuber* sp., *Peziza* sp. in *Scleroderma* sp.) dokazali, da lahko obstoj ektomikoriznih gliv ugotovljamo tudi neposredno v substratih. Pri vzorcih iz substrata lahko opazimo večje število prog. Večje število prog pomeni večje število organizmov, to pa pomeni večjo diverzitetu. Substrat je bil pred sajenjem sadik v rizotrone presejan in pasteriziran, zato gliv, ki smo jih opazili z metodo DGGE in se pojavljajo na gelu kot številne bolj ali manj intenzivne proge, nismo mogli prenesti iz okolice. Najverjetneje smo le-te v substrat prenesli s koreninskim sistemom sadik bukve ob sajenju, ali pa vse te proge predstavljajo številne ektomikorizne glive, ki so vzpostavile mikorizno povezavo z bukvijo v času poskusa na osnovi prenosa trosov po zraku ali na druge načine (rast v nesterilnih razmerah).

5 Summary

Ectomycorrhizal (ECM) fungi are the key biotic link between the sources of food and symbiotic tree partners in forest ecosystems. Understanding the operation and tracking changes in the observed forest ecosystem requires knowledge of the species composition of partners in the symbiosis. Changes in the environment, whether natural or as a result of human activities, can be quickly reflected in macro-or microsymbionts, especially for fungi. In our work we wanted to determine species or higher taxonomic group of fungi that form ECMF on beech seedlings. In addition, we wished to determine how temperature changes in the environment influence the occurrence and diversity of ECM on beech seedlings.

In the analysis of ECM types we included all seedlings of the research experiment, which was set in spring 2009. For the identification of types of ECM, we used three different methods: anatomical-morphological methods by AGERER (1987-2008), molecular methods and phylogeny. Using anatomical-morphological methods, we briefly describe the 8 types of ECM. Using molecular methods, we have one type of ECM to confirm and identify other unknown ECM types. Despite the sophistication of molecular methods, we were unable to identify two types of ECM, so we used a third method, construction of phylogenetic trees. Together, we identified six ECM types.

Based on the data obtained in determining the types of ECM in beech seedlings, we tried to determine how the temperature conditions in the environment affect the diversity of ectomycorrhizae. Ectomycorrhiza is optimally developed in an environment that is optimal for both partners that form it. Optimal annual average temperature for the growth and development of beech is 8°C. Most ECM were identified on beech seedlings, which were grown at a temperature of 15-20 °C, which is the closest of all experiments to the optimal average growth temperature of 8°C of beech. Based on our data, we conclude that most mycorrhizal connections develop in those areas, where external factors, such as temperature, are optimal for both partners that form an ECM.

Warming in forest ecosystems can be caused by global climate change, as well as by direct anthropogenic impacts, including the change of land-use, compaction and exposure of bare soils after heavy machinery works in forest. Such exposed bare soils absorb more heat than soils covered with a vegetation layer. Both climate warming and soil exposure influence the heterotrophic respiration and functioning of the two key elements in forest soil, i.e. fine roots and mycorrhiza. It is necessary to emphasize that the small temperature changes in the environment strongly influence the development and functioning of fine roots and mycorrhiza in the soil and thus the dynamics of carbon allocation in forest trees and forest ecosystems. In our research we have shown the effects of temperature regime on growth and development of ECM in the soils. Carbon dynamics and carbon flow between the organisms will be researched during our further studies.

6 Zahvala

6 Acknowledgements

Analize sta financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano v okviru projekta L4-2265 in v sklopu izdelave diplomske naloge (Ines Štraus). Zahvaljujemo se drevesnici Omorika Muta za sadike bukve in dr. Matjažu Čatru za opravljeno meritev intenzitete svetlobe.

7 Viri

7 References

ABARENKOV, K. *et al.*, 2010. The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186 (2): 281 - 285

AGERER, R., 1987-2008. *Colour atlas of ectomycorrhizae*, 13th Edition. – München, Einhorn Verlag, ločena paginacija

AGERER, R., 1991. Characterisation of ectomycorrhiza. V: *Techniques for the study of mycorrhiza*. J.R. Norris,

AGERER, R. / RAMBOLD, G. 2004–2010 [first posted on 2004-06-01; most recent update: 2009-01-26]

DEEMY – An Information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. www.deemy.de – München, Germany

ARSO. 2010. Agencija Republike Slovenije za okolje. ARHIV-Dnevni podatki. <http://meteo.arso.gov.si/met/sl/app/webmet/>

BLAST. 2010. The basic local alignment search tool (BLAST) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_P R O G R A M S = m e g a B l a s t & P A G E _ T Y P E = B l a s t S e a r c h & S H O W _ D E F A U L T S = o n & L I N K _ L O C = b l a s t h o m e

COURTY *et al.* 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 679-698

BRIDGE, P.D., 2002. The history and application of molecular mycology. *Mycologist*, 16: 90-99

COURTY, P. *et al.*, 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 679-698

CUDLIN, P. *et al.*, 2007. Fine roots and ectomycorrhizas as indicators of environmental change. *Plant Biosystems*, 141, 3: 407-425

EGGER, K.N., 1995. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1415-1422

FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies-an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 4: 783-791

FLEMING L. V., 1985. Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi of birch (*Betula* sp.) seedling root systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 17 (5): 591 – 600

GARDES, M. / BRUNS, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of ectomycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113.118

GASCUEL, O., 1997. BioNJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 685-695

GIANINAZZI-PEARSON, V., 1984. Host-fungus specificity in mycorrhizae. V: *Genes involved in plant-microbe interactions*. Verma D.P.S., Hohn T.H. (Ur.). Springer, Vienna: 225-253

GREBENC, T., 2005. Tipi ektomikorize na bukvi (*Fagus sylvatica* L.) v naravnem in gospodarskem gozdu. Doktorska disertacija. 1-24

GREBENC, T. / KRAIGHER, H., 2005. SOP1 – LABFIGE_GIS 2005. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, 1-10

GUINDON, S. / GASCUEL, O., 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704

KATO, K. / ASIMENSOS, G. / TOH, H., 2009. (Methods in molecular biology 537:39-64) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In *Bioinformatics for DNA*

Sequence Analysis edited by D. Posada

- KIRK P. M *et al.*, 2008. Dictionary of fungi, 10th Edition. CABI Europe – UK.
- KRAIGHER, H. / AGERER, R. / JAVORNIK, B., 1995. Ectomycorrhizae of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterized by anatomical and molecular tools. *Mycorrhiza*, 5: 175-180
- KRAIGHER, H. / BATIČ, F. / AGERER, R., 1996. Types of ectomycorrhizae and mycobioindication of forest site pollution. *Phyton*, 36. 115-120
- KRAIGHER, H. *et al.*, 2007. Types of ectomycorrhiza as pollution stress indicators: case studies in Slovenia. *Environ Monit Assess*, 128: 31-45
- LOBUGLIO, K. F., 1999. *Cenococcum*. V: Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profil. Cairney J. W. G. in Chambers S. M. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 296-299
- MARTIN, F. *et al.*, 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452: 88 – 93
- MARMEISSE, R. *et al.*, 1999. *Hebeloma*. V: Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profil. Cairney J. W. G. in Chambers S. M. (eds.). Berlin, Springer-Verlag, 90-91
- NCBI. 2010. The national center for biotechnology information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>
- NORVELL L. L. / EXETER R. L., 2004. Ectomycorrhizal epigeous basidiomycete diversity in Oregon Coast Range *Pseudotsuga menziesii* forests—Preliminary observations. *Fungi in forest ecosystems: Systematics, Diversity, and Ecology*: 159 – 189
- PARADI, I. / BAAR, J., 2005. Mycorrhizal fungal diversity in willow forests of different age along the river Waal, The Netherlands. *Forest ecology and management*, 237 : 366–372
- PEINTNER, U. / MONCALVO, J.M. / VILGALYS, R., 2004. Toward a better understanding of the infrageneric relationships in *Cortinarius* (Agaricales, Basidiomycota). *Mycologia*, 96 (5): 1042-1058
- PENNANEN, T. / PAAVOLAINEN, L. / HANTULA, J., 2001. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples, *Soil Biol. Biochem.* 33 : 697–699
- POSADA, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*. 25: 1253-1256
- PÜTTSEPP, Ü. / ROSLING, A. / TAYLOR, A. F. S., 2004. Ectomycorrhizal fungal communities associated with *Salix viminalis* L. and *S. dasyclados* Wimm. clones in a short-rotation forestry plantation. *Forest ecology and management*, 196: 413-424
- SURS. 2010. Statistični urad Republike Slovenije. Povprečne letne in mesečne temperature zraka po meteoroloških postajah, Slovenija. [http://www.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156101S&ti=Povpre %E8ne+letne+in+mese %E8ne+temperature+zraka+po+meteorolo %9Akih+postajah %2C+Slovenija&path=../Database/Okolje/01_ozemlje_podnebje/10_01561_podnebni_kazalniki/&lang=2](http://www.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156101S&ti=Povpre%20%28E8ne+letne+in+mese%20E8ne+temperature+zraka+po+meteorolo%20%28Akih+postajah%20C+Slovenija&path=../Database/Okolje/01_ozemlje_podnebje/10_01561_podnebni_kazalniki/&lang=2)
- TAMURA, K. *et al.*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* 24:1596-1599
- WHELAN, S. / LIÒ, P. / GOLDMAN, N., 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends in genetics*, 17 (5): 262 – 272
- WHITE, T.J. *et al.*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Ur.). San Diego, Academic Press: 315-322
- WU L. / GUO S., 2008. Interaction between an isolate of dark-septate fungi and its host plant *Saussurea involucrata*. *Mycorrhiza*, 18: 79-85
- ŽELEZNIK, P *et al.*, 2007. CASIROZ: Root parameters and types of ectomycorrhiza of young beech plants exposed to different ozone and light regimes. *Plant biology*, 9: 298-308