



## **GOZDARSKI INŠTITUT SLOVENIJE**

Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

### **IMPROVEMENT OF TRUFFLE CULTIVATION VIA NOVEL QUALITY CONTROL, SOIL ANALYSIS AND INOCULATION METHODS**

**(ADVANCED INOCULATION METHODS, NOVEL SITE SELECTION TOOLS AND THE ESTABLISHMENT OF MYCELIAL GENE BANKS FOR ECONOMICALLY IMPORTANT TRUFFLE SPECIES WILL IMPROVE TRUFFLE CULTIVATION)**

**EUREKA: E! 3835- CULTUBER**

(trajanje: 01.03.2007 – 28.02.2010)

Final report – scientific content / Zaključno poročilo – vsebinski del)

Tine Grebenc (odgovorni nosilec projekta), Marko Bajc, Melita Hrenko, Barbara Štupar, Igor Dakskobler, Gregor Božič, Nataša Milenković, Hojka Kraigher, Žaklina Marjanović

Ljubljana, 01.03.2010

GOZDARSKA KNJIZNICA

GIS K E  
611

GIS BF - GOZD.



12011000625

COBISS •



## 1. Uvod – opis vsebine in predlaganih izboljšav (v angleščini) (vir: Prijavni obrazec)

Truffles are among the most precious and expensive foods in the world. As mycorrhizal fungi, true truffles grow exclusively in association (symbiosis) with compatible host tree species (oaks, hornbeam, poplars, pines, etc.). Some truffle species like the French Perigord truffle are already cultivated in large-scale plantations, while the precious white truffle (*Tuber magnatum* Pico) is currently harvested from natural populations only. Truffles are commonly associated with the gastronomic culture of FRANCE and ITALY, where the harvest and marketing of the most appreciated species have a long tradition. Recently, it became clear that the natural diversity of commercial truffle species in SERBIA, and, to a lesser extent, in AUSTRIA, is as high. Most importantly, the precious white truffle has been reported frequently from the lowlands of SERBIA. Evidently, there is a huge natural potential that still awaits exploitation. On the other hand, the natural populations of these fungi might be vulnerable, if truffling pressure increases, so a strategy for the wise use of this resource is needed. Truffle cultivation in truffle orchards or plantations is an economically and ecologically viable form of agriculture that involves the use of natural truffle populations as genetic resources and that may help to protect them from overexploitation. Truffle cultivation is an inherently sustainable economic activity, since it requires a long-term perspective and a good understanding of soil ecology.

**ECONOMIC ADVANTAGES** - In contrast to most agricultural products, there is no overproduction of truffles. The notoriously high prices for truffles are the market's expression of the shortage of supply. - Truffles grow well in some less fertile soils which are of low value for field crops. Truffle cultivation may have a high impact in agriculturally marginal areas where the need for alternative sources of income is particularly acute. - Truffle cultivation may be a motivation for restoring the productivity of abandoned land. - Truffle cultivation can be a strong asset for regional marketing, tourism, gastronomy and related services.

**ECOLOGICAL ADVANTAGES** \* Truffles are an integral part of natural habitats and ecosystems that are very important for biodiversity conservation. The plantation of truffle orchards will create near-natural islands of biodiversity in the agricultural landscape. The use of autochthonous genetic resources will further contribute to the prevention of genetic erosion. \* Truffle cultivation requires no or very limited inputs of fertilisers and no pesticides, thus protecting ground water and the environment. \* Mycorrhiza formation contributes to soil stability and functioning. Reforestation with mycorrhized seedlings will save the soil from further degradation. \* The use of barren land and fallows for truffle cultivation may limit the colonisation of land by weedy non-autochthonous species like *Robinia pseudacacia*. Despite the evident economic opportunities, truffle cultivation is still limited by serious drawbacks: yields are almost unpredictable, ranging from zero or a few kg/ha to over 200 kg/ha, preventing a realistic calculation of future returns on investment. This problem may be linked to uncertainties in site selection, seedling quality, monitoring tools and management practices. Another shortcoming of the current state in truffle cultivation is that trees reliably inoculated with *Tuber magnatum* are absent from the market.

**PROJECT OBJECTIVES** - Development of more reliable inoculation techniques applicable even to recalcitrant species such as *Tuber magnatum*. - More precise definition of suitable soil conditions, ecological conditions and management practices for truffle cultivation. - Design of monitoring tools, e.g. for measuring the effect of irrigation schemes. - Systematic collection and molecular characterisation of genetic resources (seedlings and truffles) including development of quick and easy-to-scale-up methodology for estimating inoculation

success in greenhouses and in-situ (plantations, forests, parks). Keywords: truffle, mycorrhiza, symbiosis.

### **Technological Development Envisaged**

Truffles are ectomycorrhizal fungi, i.e. for sporocarp production they need to establish a soil-located symbiosis called ectomycorrhiza with a compatible host-tree. Once the truffle mycelium envelope the small feeding roots of the tree the essential exchange of nutrients and water starts through the organ called mycorrhiza. Therefore it is not possible to produce truffles under laboratory conditions. The only successful way is to establish plantations of the host trees that were previously inoculated with truffle mycelium and that have already formed truffle ectomycorrhiza. Such a plantation will need several years before the trees become strong enough to support sporocarp (truffle) production. In order to improve the reliability and success of truffle cultivation, the following technological developments are outlined:

**1. MONITORING AND QUALITY CONTROL TOOL: TRUFFLECHIP** The development of DNA based methods for the rapid simultaneous identification of truffle species and competitive fungi is required for quality control of mycorrhized seedlings and truffle products, for analysis of the soil microbiology of natural truffle beds and for the monitoring of truffle plantations. As a first step, the fungal communities of natural truffle beds will be explored by rapid community profiling methods, molecular cloning and sequence analysis. Molecular cloning of PCR amplified fragments (nrITS+partial LSU) and sequence analysis is a culture-independent method for detecting the fungal species (ribotypes) present from the fungal communities of truffle beds. Fungal species will be characterised by phylogenetic placement. The obtained sequence data will be used to design the TruffleChip, a truffle-specific DNA micro-array that can be used for the identification of truffle species and associated or competitive fungal species in soil, roots and truffle products. This technological innovation will be a valuable tool for: - Improved quality control for seedling production - Prevention of the potential introduction of less valuable truffle species, particularly exotic species, e.g. 'Chinese truffles'. - Improved detection and prevention of fraud in the marketing of truffle seedlings, fresh truffles and truffle products. - Detection of potential competitive fungi in the field for better site selection and prediction of the site potential.

**2. ESTABLISHMENT OF PROTOCOLS FOR BUILDING A GENE BANK OF GENETIC RESOURCES FOR TRUFFLE CULTIVATION** The following tasks are to be accomplished: \* Collecting samples from trees that were previously recorded to have high truffle production; \* Finding the most efficient way for recovering the tree seedlings from this material, \* Collecting the suitable truffle genotypes (from the high productive mycelia) and related soil samples; \* Establishing a gene bank for the truffle-genes and tree lines. The establishment and maintenance of gene banks from living trees and mycorrhizal fungi is an important but labour intensive task, which requires continuous optimisation of protocols, since standard protocols are not applicable to notoriously recalcitrant organisms like *Tuber magnatum* or some woody perennials. Both groups involved in this project have vast experience in the in-vitro cultivation of woody plants and ectomycorrhizal fungi.

**3. DEVELOPMENT OF VIABLE INOCULATION TECHNIQUES FOR TRUFFLE SPECIES THAT ARE NOT YET SUCCESSFULLY CULTIVATED, PARTICULARLY THE PRECIOUS WHITE TRUFFLE.** The inoculation of host plants with truffle species is a highly demanding task. It is a challenge to perform mycelial growth and successful inoculation. The inoculation protocols will be optimised to meet the following criteria: - high level of mycorrhization with the target truffle species - selection of high performing genotypes - absence of competitive fungi - amenable for up-scaling - stability of the symbiosis after out-planting of the tree.

4. ANALYSIS OF THE MICROBIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF NATURAL TRUFFLE BEDS IN SERBIA AND AUSTRIA The basic soil properties of productive truffle beds in ITALY, FRANCE and SPAIN are comparatively well investigated. However, due to the different geological histories of these countries and central and south-east Europe, the data from Western Europe are of very limited value if only applied to AUSTRIA or SERBIA. Hence, there is a strong need to analyse the soil properties of local truffle beds, as a basis for proper site selection.

**2. Vsebinsko poročilo za zadnje obdobje poročanja (končno poročilo o projektu  
(Vir: Priloga 2 »Poročilo o delu na projektu«)**

**POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA EUREKA ZA  
OBDOBJE 1.1.2010 – 28.2.2010 (navedite datum od - do)**

**I. SPLOŠNI PODATKI**

Akronim projekta:	CULTUBER
Številka pogodbe z ministrstvom:	3211-07-000141
Celoten naslov projekta:	Improvement of truffle cultivation via novel inoculation methods, soil analysis and quality control – CULTUBER (Izboljšana metodologija gojenja tartufov z novimi metodami inokulacije, analizami zemlje in kontrolo kvalitete)
Trajanje projekta:	1.3.2007 – 28.2.2010
Naslov organizacije:	Gozdarski inštitut Slovenije Večna pot 2, 1000 Ljubljana
Odgovorni nosilec projekta:	dr. Tine Grebenc
Kontaktna oseba projekta (navedite tudi telefon in e-pošto):	dr. Tine Grebenc tel: 01/2007845 tine.grebenc@gozdis.si
Zakoniti zastopnik organizacije:	dr. Mirko Medved, direktor

**II. VSEBINA IN REZULTATI DELA NA PROJEKTU ZA LETO 2010:**

Po posameznih točkah odgovorite na vsa vprašanja. Poročilo naj bo dolgo vsaj 4 strani formata A4!

**1. STROKOVNE OSNOVE**

Rod *Tuber* je ektomikorizni rod gliv, razširjen v večjem delu J in JV Evrope. Po svetu znanih okoli 60 taksonomsko uveljavljenih vrst gomoljik v ožjem smislu (rod *Tuber*), ki spadajo v skupino askomicet (*Tuberaceae*, *Ascomycotina*, *Fungi*). Rod je splošno razširjen in številčen predvsem v zmernem in mediteranskem pasu vseh kontinentov. Vse vrste, vključno z ekonomsko najpomembnejšo vrsto *Tuber magnatum* (bela gomoljika), tvorijo podzemne trosnjake in imajo temu primerno razmnoževalno strategijo. S stališča komercialne proizvodnje so na območju Slovenije in širšega področja Balkana zanimive predvsem nekatere vrste t.i. črnih tartufov (*T. macrosporum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*) in vrsta belega tartufa (*T. magnatum*), ki je tudi vrsta, na

katero smo v raziskovalnem delu osredotočili. Kot za večino ostalih ektomikoriznih vrst s t.i. "late stage" strategijo tudi gomoljike, in še posebej vrsta *T. magnatum*, za svoje uspevanje in tvorbo trosnjakov nujno potrebujejo vitalnega rastlinskega partnerja in specifične rastne pogoje. Njihova usmerjena (načrtna) kultivacija je zato težavna, oziroma v mnogih primerih še ne dovolj poznana, za uspešno produkcijo.

V literaturi je le malo poročil o uspešnem gojenju vrste v naravi oziroma je bilo večina dosedanjih eksperimentov zaradi nezadostnega znanstveno-strokovnega pristopa in neprimernih metod neuspešnih. Večina uspešnih primerov gojenja izhaja in temelji na znanju in podatkih iz zahodne Evrope (pretežno Francija in Italija), ki seveda temeljijo na rastihih pogojih vrst v omenjenih državah, torej gre za pretežno mediteranske klimate. Znanje o pestrosti, biologiji, rastihih pogojih, in na splošno o razširjenosti podzemnih gliv na področju JV Evrope, je minimalno oziroma ga praktično ni. Nekateri redki poskusi gojenja podzemnih gliv na področju Slovenije po zgledu zahodnih držav ostajajo po večini neurejeni, neorganizirani in brez prave podpore izvirnega in lokalno utemeljenega znanja. V nadaljevanju povzemamo delo v celotnem obdobju trajanja projekta, ter posebej izpostavimo naloge, ki smo jih opravili v zadnjem obdobju poročanja (t.j. januar in februar 2010.)

## 2. NAMEN RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

Namene celotnega projekta smo združili v štiri tematske sklope, od katerih vsak temelji na specifični metodologiji in ciljih:

1. Iskanje, herbarizacija (dolgotrajno shranjevanje), karakterizacija in kultivacija glivnega materiala podzemnih gliv, s poudarkom na rodu *Tuber*, sistematično vzorčenja gomoljik (*Tuber* spp.) na območju Slovenije in izpopolnjevanje pristopov gojenja v čisti kulturi in identifikacije. Metode identifikacije smo podprli s primerjalno analizo na molekularnem nivoju (pestrost DNK markerjev). Nadaljevali smo tudi z vzpostavitvijo baza molekularnih markerjev za vrste in seve s področja Slovenije (in širše), za namen rutinske analize materiala in spremljanje uspešnosti postopkov inokulacije in gojenja inokuliranih sadik znotraj projekta (za uporabo v gojitvene, remediacijske ali revitalizacijske namene). Osvetliti smo poskusili tudi nekatera nerešena taksonomska vprašanja med vrstami iz rodu *Tuber*.
2. Znotraj sklopa ekološke karakterizacije tipičnih rastišč belega tartufa na območju Slovenije kot prehodne cone med znanimi rastišči v Italiji in rastišči na Balkanu, smo dokončati popise vegetacije, analize tal primerjalno med produktivnimi in neproduktivnimi mikrolokacijami in primerjati rezultate glede na lastnosti rastišč vrste *T. aestivum*. Pridobljene značilnosti rastišč simulirati pri *in vitro* kultivaciji micelija belega tartufa in drugih zanimivih vrst iz tega rodu ter pri inokulaciji in vzgoji inokuliranih sadik v kontroliranih pogojih. Namen karakterizacije rastišč je bil tudi pridobivanje podatkov za vpeljavo in validacijo modeliranja.
3. Vzgoja kvalitetnih in zdravih sadik inokuliranih z izbrano vrsto gomoljik, ki bodo ustrezno certificirane oziroma označene ter uporabljene v poskusnih nasadih za dolgoročno spremljanje mikorize in uspešnosti tvorbe trosnjakov.
4. Spremljanje talnih, klimatskih in hidroloških lastnosti znanih rastišč vrste *T. magnatum*, z uporabo znanih ali izpopolnjenih metod meritev ter aplikacija na



modeliranje današnje in potencialne prihodnje razporeditve izbranih vrst in njihovih rastišč

V letu 2010 smo od zastavljenih nalog pretežno zaključevali z meritvami in analizami rezultatov ter pripravami publikacij, smernic in zadnjih podrobnosti vezanih na pripravko gojitvenih postopkov pri partnerju iz industrije, ki je v tem letu poskusno zagnal proizvodnjo omejenega števila inokuliranih sadik.

### 3. NATANČEN OPIS POTEKA DELA/AKTIVNOSTI

Projekt je tekom celotnega obdobja, kljub izpadu sofinanciranja v letu 2009, v večji meri potekal po izhodiščnem načrtu. Del nalog, vezanih na izvajanje s strani partnerja iz industrije še niso dokončani, saj gre za del, ki zahteva najmanj enoletno rast inokuliranih sadik, katerih uspešnost inokulacije z novimi pristopi bomo dokončno preverili konec letošnje rastle sezone in bodo spomladi prihodnje leto pripravljene za sajenje.

#### 3.1 POSKUSI/ANALIZE/RAZISKAVE/POSTOPKI/STORITVE ...

Ad 1.

V povezavi z molekularnimi analizami glivnega materiala smo v času trajanja projekta intenzivno vzorčili glive na terenu (s pomočjo specializiranih psov), ki smo jih uporabili kot izvirni genetski material za inokulacije in genesko banko v živih kulturah (*in vitro* pogoje gojenja na pol-definiranih gojiščih). Redno smo vzorčili na zastavljenih raziskovalnih ploskvah in na drugih področjih in regijah po Sloveniji ter s tem pridobili večje število svežih vzorcev podzemnih gliv. Vse najdene vzorce smo tudi ustrezno shranili v herbariju (Herbarij in Mikoteka GIS). V laboratoriju smo opravljali zastavljene naloge s področja dopolnjevanja javnih baz podatkov (PCR-RFLP baza podatkov, baze nukleotidnih zaporedij), na osnovi katerih smo izvajali bazične analize taksonomije in biodiverzitet gomoljik. Za izbrane najdene vzorce (tako slovenske, kot vzorce srbske partnerske inštitucije) smo opravili celovito analizo molekularne pestrosti na nivoju vrste, pri čemer smo odkrili, da se na področju Balkana najverjetneje pojavlja še najmanj ena nepopisana vrsta gomoljike. Ugotovljena medvrstna in znotraj vrstna pestrost molekularnih označevalcev je osnova za pripravo specifičnih molekularnih lovilcev (prob - začetnih oligonukleotidov) in predpogoj za uspešno ugotavljanje vrste ektomikorizne glive v simbiozi v laboratorijskih pogojih inokulacije sadik. Aplikacija pristopa, ki smo jo opravili v l. 2010, se je izkazala kot uspešna pri vseevropski študiji filogeografije rodu *Tuber*. V raziskavi smo s filogeografskim pristopom ugotavljali ali izbrane vrste iz rodu izkazujejo geografsko diferenciranost na nivoju genov rRNK. Iz razpoložljivih nukleotidnih zaporedij, ki izvirajo iz večjega dela areala vrst roda *Tuber*, smo za več vrst ugotovili razporejanje in ločevanje genotipov glede na položaj ledeniških zatočišč v zadnji ledeni dobi in glede na znane poledenodobne migracijske poti haplotipov drevesnih partnerjev (hrastov). Območje Slovenije se je izkazalo za območje mešanja več genotipov variabilnih vrst. Prisotnost več genotipov ene vrste gliv nakazuje možnost križanja oziroma mešanja dveh poledenodobnih migracijskih poti, kar daje območju dodatno vrednost s stališča biotske raznovrstnosti. Poznavanje genetske pestrosti in funkcionalne povezave glivnih in rastlinskih genotipov lahko nudi usmeritve pri gospodarjenju z gozdovi, pridobivanju gozdnih proizvodov in morebitnem načrtnem gojenju drevesnih in glivnih partnerjev v simbiozi z namenom pridelave gliv.

## Ad 2.

Ekološka karakterizacija tipičnih rastišč belega tartufa na območju Slovenije kot prehodne cone med znanimi rastišči v Italiji in rastišči na Balkanu je zajemala osnovne ekološke meritve (T, vlaga, vegetacija, talne lastnosti in klimatski pogoji uspevanja). Opravili smo primerjalne analize lastnosti produktivnih rastišč in primerjalnih neproduktivnih lokalitet (primerjalne osi Slovenija-Srbija ter razlike v karakteristikah med rastišči vrst *T. magnatum* in *T. aestivum*). S kemijskimi in fizikalnimi analizami smo sledili količine in koncentracije bistvenih hranil (C, N, S, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, Mg, Ca) in fizikalne lastnosti tal (tekstura, pH). Na osnovi dobljenih podatkov smo ugotovili optimalne vrednosti za uspevanje izbranih vrst gomoljik, ki bodo služile tudi kot usmeritve pri pripravi umetnih substratov za gojenje, za prilagoditve naravnih rastišč in kot podatki za validacijo modela pojavljanja gomoljik.

Opravljene meritve temperature in vlage tal na produktivnih in neproduktivnih rastiščih smo spremljalo primerjalno, glede na dinamiko pojavljanja zrelih trosnjakov izbranih vrst gomoljik. Meritve smo zaključili, analiza pa je delno še v delu in bo predvidoma zaključena in pripravljena za publikacijo še v letu 2010. Merjene parametre smo korelirali z dinamiko pojavljanja, z namenom pridobivanja okoljskih indikatorjev začetka, trajanja in zaključka pojavljanja izbranih vrst znotraj rastnega leta, kot usmeritev nabiralcem in gojiteljem za časovno bolj usmerjeno iskanje, tako na naravnih rastiščih (v okviru zakonskih omejitev), kot na prihodnje osnovanih plantažah. Na izbranih raziskovalnih ploskvah, ki predstavljajo naravna rastišča izbranih vrst gomoljik, smo opravili tudi fitocenološke popise (popis rastlinskih združb v l. 2009, analiza in priprava za objavo v l. 2010), kot dopolnilne razlagalne podatke zahtev za uspevanje izbranih vrst gomoljik.

## Ad 3.

Priprava metodologije, razvoj substratov, izbor ustreznega izvornega materiala in končno priprava, inokulacija in spremljanje uspeha postopkov, je časovno najzahtevnejši del naloge in se iz tega razloga še ni v celoti zaključil. Dokončno bo cikel zaključen z uspešno presaditvijo inokuliranih sadik na izbrane lokacije, v končnem poročilu pa se bomo omejili le na del, ki smo ga uspešno zaključili v času financiranja naloge. Kot ključen del uspešne inokulacije je seveda izvorni material. Izvor in izbor rastlinskega materiala, torej semena drevesnih vrst za inokulacijo (z izjemo leske), določa Zakon o gozdnem reprodukcijskem materialu (Ur.L. 58/2002). Izvorni material za glive še ni določen, a na osnovi lastnih rezultatov (filogeografska študija) kaže na to, da bi bilo primerljive principe provenience oz. izvora glivnega materiala za inokulacijo uporabiti tudi za glivnega partnerja v ektomikorizi.

Izbrane drevesne vrste za inokulacijo smo uporabili pripraviti sterilne kulture belega topola in pridobiti semenski material vrst *Ostrya carpinifolia*, *Corylus avellana*, *Quercus pubescens* in *Quercus petraea*. Inokulacije smo izvedli v kontroliranih laboratorijskih prostorih in inokulirane sadike v polsterilnem substratu z dodatkom inokuluma. Substrate in delno tudi rastne pogoje v prvih mesecih po inokulaciji smo specifično prilagodili glede na ekološke zahteve izbrane vrste glive. Natančen opis metodologije je del smernic za gojenje (pripravljene v l. 2010), ki zaenkrat ostajajo še tajne.

Za pripravo protokola za ugotavljanje uspeha inokulacije (pripravljeno v slovenskem jeziku v l. 2010) smo pridobili certifikat tečaja na INRA Clermont-Ferrand, kjer smo se pri pooblašeni inštituciji za certifikacijo v Franciji seznanili z metodami hitrega

ugotavljanja uspešnosti inokulacije sterilnih sadik na osnovi morfoloških znakov (metodologija primerna tudi za delo na terenu), ugotavljanje deleža mikoriziranih korenin in ocen primernosti sadike za prodajo oziroma svetovanje za nadaljnje tretiranje. V zadnjih dveh mesecih trajanja projekta smo poskusno zagnal proizvodnjo omejenega števila inokuliranih sadik, ki zaenkrat kažejo dobro rast in po preliminarnih analizah korenin tudi zadovoljivo stopnjo okuženosti z izbrano glivo.

Ad 4.

Spremljanje talnih, klimatskih in vlažnostnih lastnosti znanih rastišč vrste *T. magnatum*, ter tudi *T. aestivum* in *T. melanosporum*, z uporabo znanih ali izpopolnjenih metod meritev, ni pomembno le uspešno gojenje danes ampak tudi v dolgoročni perspektivi. Tako je v zaključni fazi razvoja ob koncu ocenjevalnega obdobja (l. 2010) eksperimentalni računalniški model, katerega namen je modeliranje trenutne in potencialne razširjenosti primernih rastišč za uspevanje izbranih vrst gomoljik (oziroma širše, mikoriznih gliv), glede na njihovo trenutno biologijo pojavljanja in zahteve za uspevanje (literaturni podatki). Poznavanje in modeliranje nam omogoča tako lažje iskanje potencialnih rastiščih danes, glede na današnjo razporeditev drevesnih vrst s potencialno za tvorbo ektomikorize z gomoljikam, omogočajo pa nam tudi pogled v prihodnost. Z modelnim pristopom za področje Slovenije, smo ugotavljali potencialne prihodnje razporeditve izbranih vrst in njihovih rastišč v perspektivi scenarijev morebitnih klimatskih sprememb.

### 3.2 MATERIALI/PROIZVODI/TEHNOLOGIJE/APLIKACIJE/INOVACIJE ....

Ad 1.

Med ključne izpopolnjene tehnologije, ki so rezultat projekta, je sistem identifikacije na ravni vrste za vse razpoložljive vrste gomoljik (rod *Tuber*). Splošno uveljavljene postopke identifikacije gliv s pomočjo analize izbranih informativnih regij genoma, smo prilagodili (optimizacija metod ekstrakcije DNK, pomnoževanja, čiščenja, kontrole uspešnosti čiščenja in analiz) za uporabo pri gomoljicah, tako za trosnjake (gomolje), kot tudi za glivo v ektomikorizi.

Optimizirali smo postopek kvantifikacije izbrane vrste glive v izhodnem materialu s poudarkom na sledenju in kvantifikaciji v umetnih (inokuliranih) substratih in na vzorcih koreninskega sistema. Kvaliteta tehnologije temelji tudi na izboru ustreznega in kvalitetnega referenčnega materiala, si smo ga (in ga bomo tudi v prihodnje) uporabljali.

V obliki herbarijskega referenčnega materiala smo zaobjeli vse vrste, ki se pojavljajo na področju Slovenije in širše in predstavlja pomemben rezultat projekta, ki bo omogočal še nadaljnje analize.

Kot bistven element metode identifikacije je tudi izpopolnjena metoda filogenetske analize in filogenetskega pristopa, ki bolje (z večjo in statistično boljše podprto ločljivostjo) ločuje med sabo vrste na molekularnem nivoju. Molekularni pristop nam omogoča jasnejše ločevanje različnih genotipov osebkov, s čimer lahko bolje opredelimo izvor posameznega izolata glive, kar je en od bistvenih ciljev projekta, saj le tako lahko potrdimo, da je za inokulacije in kultivacijo res uporabljen glivni material lokalnega izvora.

Ad 2.

Pripravljene so smernice za gojenje gomoljik, prilagojene na razmere, kakršne veljajo v Sloveniji in širše na Balkanu, v katere smo smiselno vkomponirali rezultate talnih analiz, klimatskih pogojev uspevanja in spremljajoče vegetacije na rastiščih in tako dobljene optimalne vrednosti za uspevanje izbranih vrst gomoljik in usmeritve za morebitno gospodarjenje z nasadi za proizvodnjo gomoljik.

Ad 3.

Poleg že prej omenjenih smernic, ki povzemajo vsebine zakonodaje in izbora glivnega materiala, smo kot ključni proizvod projekta pripravili pilotno proizvodnjo, spremljanje in certifikacijo sadik izbranih drevesnih vrst, inokuliranih z izbranimi vrstami ektomikoriznih gliv (gomoljik): Celoten postopek smo preverili pri partnerju iz industrije, ki bo predvidoma nadaljeval s proizvodnjo tudi v prihodnjih letih. V pripravi je tudi zaščita sestave substrata in celotnega postopka proizvodnje, kot intelektualne lastnine (patent oziroma izboljšava postopka).

Ad 4.

Zadnja točka projekta je s stališča izvedbe najbolj teoretična, a ima vsaj dva bistvena aplikativna rezultata. Rezultate modeliranja bodo lahko uporabniki uporabili v dveh smereh: a) uporaba modela današnje razširjenosti ustreznih pogojev za uspevanje izbrane vrste gomoljik za iskanje novih potencialnih področij uspevanja v Sloveniji z namenom tarčnega iskanja novih habitatov in b) modeliranje razporeditve potencialnih rastišč v prihodnosti v luči predvidenih pogojev v okolju glede na izbrane modele pričakovanih klimatskih sprememb, z možnostjo usemrjanja pri izbiri optimalnih (in v prihodnosti optimalnih) področij za osnovanje plantaž za gojenje. Rezultati modeliranja so v zaključnih fazah priprave in validacije in jih bomo v kratkem publicirali v znanstveni in strokovni literaturi.

### **3.3 DISEMINACIJA, IZOBRAŽEVANJE/USPOSABLJANJE/PRENOS ZNANJA**

V času smo se udeležili izobraževanja na INRA Clermont-Ferrand, kjer smo se pri pooblaščenih inštituciji za certifikacijo v Franciji seznanili z metodami hitrega ugotavljanja uspešnosti inokulacije. Tečaj je zajel delo z vsemi v Evropi uporabljenimi lesnatimi vrstami in komercialno zanimivimi vrstami gomoljik. Dodatno smo se seznanili z in vitro tehnikami gojenja in različnimi sistemi osnovanja plantaž za gojenje gomoljik ter prvih faz vzdrževanja in spremljanja plantaž do začetka njihove rodnosti. Znanje in izkušnje, pridobljen v času projekta smo predstavili na več znanstvenih in tudi strokovnih srečanjih, med katerimi naj omenim le svetovni vrh na področju raziskav gomoljik (srečanje Tuber 2008, Spoleto Italija), simbontskih odnosov med glivami in drevjem (ICOM6, 2009 – International conference on Mycorrhizas, Belo Horizonte, Brazilija), bazične biologije glivnih celic (The fungal cell 2009, Dundee, Velika Britanija) in domačih srečanjih na temo gozd in les (Znanstveno srečanje z okroglo mizo: Gozd in le) in z vabljenim predavanjem na 5. Slovenskem simpoziju o rastlinski biologiji z

mednarodno udeležbo. V pripravi je tudi poglavje v poljudni knjigi, namenjeni kmetom in gozdarjem (podpisana pogodba z založnikom)

## IZDANE PUBLIKACIJE

(izpis iz sistema COBISS)

### 1.01 Izvirni znanstveni članek

GREBENC, Tine, BAJC, Marko, KRAIGHER, Hojka. Poledenodobne migracije mikoriznih rastlin in glivnih partnerjev v simbiozi : primer rodu *Tuber* = Post-glacial migrations of mycorrhizal plants and ectomycorrhizal partners : an example of the genus *Tuber*. *Les (Ljublj.)*, 2010, let. 62, št. 5, str. 149-154, ilustr. [COBISS.SI-ID [2964390](#)]

MARJANOVIĆ, Žaklina, GREBENC, Tine, MARKOVIĆ, M., GLIŠIĆ, Aleksa, MILENKOVIĆ, Miroljub. Ecological specificities and molecular diversity of truffles (genus *Tuber*) originating from mid-west of the Balkan Peninsula. *Sydowia*, 2010, vol. 62, no. 1, str. 67-87, ilustr. [COBISS.SI-ID [3008934](#)]

KATANIĆ, Marina, GREBENC, Tine, HRENKO, Melita, ŠTUPAR, Barbara, GALIĆ, Zoran, ORLOVIĆ, Saša, KRAIGHER, Hojka. Prva identifikacija tipova ektomikorize u nasadu belih topola (*Populus alba* L.) kod Novog Sada = First identification on types of ectomycorrhiza in white poplar (*Populus alba* L.) stand in vicinity of Novi Sad. *Topola*, 2008, no. 181/182, str. 49-59, ilustr. [COBISS.SI-ID [3008934](#)]

KATANIĆ, Marina, ORLOVIĆ, Saša, GREBENC, Tine, ŠTUPAR, Barbara, GALIĆ, Zoran, KOVAČEVIĆ, Branislav, KRAIGHER, Hojka. Identification of ectomycorrhizal types in a white poplar (*Populus alba* L.) plantation near Novi Sad = Identifikacija tipov ektomikorize v nasadu belega topola (*Populus alba* L.) pri Novem Sadu. *Les (Ljublj.)*,

### 1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

GREBENC, Tine, MARJANOVIĆ, Žaklina. L'influence potentielle du changement de climat sur la production des truffes dans la région des Balkans occidentaux. V: ROUSSET-ROUARD, Yves (ur.). *L'avenir de la truffe face au réchauffement climatique : actes des 11es rencontres internationales de la truffe*. S. l.: s. n., 2008, str. 105-[108]. [COBISS.SI-ID [2312358](#)]

### 1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

GREBENC, Tine, ESTEBAN, Maria P. Martin, PILTAVER, Andrej, KRAIGHER, Hojka. Identification and molecular diversity assessment of native truffles species (*Tuber* spp.) from Slovenia compared to material from herbaria = Identifikacija in ugotavljanje molekularne pestrosti pri rodu gomoljik (*Tuber* spp.) v Sloveniji, v primerjavi z referenčnim herbarijskim materialom. V: FILIPIČ, Metka (ur.), ZAJC, Irena (ur.). 4th Congress of Slovenian Genetic Society and 2nd Meeting of the Slovenian Society of Human Genetics with International Participation = IV. Kongres Slovenskega genetskega društva in II. srečanje Slovenskega društva za humano genetiko, z mednarodno udeležbo, September 28th-October 1st, 2006, Biološko središče, Ljubljana. *Genetika 2006 : Book of Abstracts*. Ljubljana: Slovensko genetsko društvo, 2006, str. 125. [COBISS.SI-ID [1744550](#)]

GREBENC, Tine, ESTEBAN, Maria P. Martin, PILTAVER, Andrej, RATOŠA, Ivan, KRAIGHER, Hojka. Mycology in Slovenia and the current research on the field of hypogeous fungi. V: *Mycologia 2006 : 5 a 12 de Novembro Bragança Portugal*. [S. l.: s. n., 2006], 4 str. [COBISS.SI-ID [1772454](#)]

GREBENC, Tine, MARTIN P., Maria, PILTAVER, Andrej, RATOŠA, Ivan, KRAIGHER, Hojka. Molecular diversity of natural Tuber species from Slovenia. V: *The fourth international medicinal mushroom conference : IMMC4, 23rd to 27th September 2007, Ljubljana, Slovenia - EU*, (International journal of medicinal mushrooms, Vol. 9 (2007), no. 3/4). Ljubljana: Biotechnical faculty, 2007, str. 199-200. [COBISS.SI-ID [1954982](#)]

HRENKO, Melita, ŠTUPAR, Barbara, GREBENC, Tine, KRAIGHER, Hojka. PCR-RFLP database : its application in ectomycorrhizal identification and assessment of fungal molecular diversity. V: *The fourth international medicinal mushroom conference : IMMC4, 23rd to 27th September 2007, Ljubljana, Slovenia - EU*, (International journal of medicinal mushrooms, Vol. 9 (2007), no. 3/4). Ljubljana: Biotechnical faculty, 2007, str. 311-312. [COBISS.SI-ID [1955238](#)]

MARJANOVIĆ, Žaklina, SALJNIKOV, E., MILENKOVIĆ, Miroljub, NIKOLIĆ, N., GREBENC, Tine. Ecological features of Tuber magnatum pico in the conditions of West Balkan - soil characterization. V: *Tuber 2008 : 3 Congresso Internazionale di Spoleto sul tartufo, Spoleto, 25-28 Novembre 2008*. [S. l.: s. n., 2008], str. 31. [COBISS.SI-ID [2295462](#)]

GREBENC, Tine, RATOŠA, Ivan, PILTAVER, Andrej, MARTIN P., Maria, KRAIGHER, Hojka, KRAIGHER, Hojka, GLIŠIĆ, Aleksa, MARJANOVIĆ, Žaklina. Diversity of the genus Tuber from the West Balkan areas using molecular characterisation. V: *Tuber 2008 : 3 Congresso Internazionale di Spoleto sul tartufo, Spoleto, 25-28 Novembre 2008*. [S. l.: s. n., 2008], str. 115. [COBISS.SI-ID [2295206](#)]

MARJANOVIĆ, Žaklina, GLIŠIĆ, Aleksa, SALJNIKOV, Elmira, MILENKOVIĆ, Miroljub, GREBENC, Tine. Tuber aestivum Vitt. in Balkan Penninsula. V: *Abstracts : First conference on the "European" Truffle Tuber aestivum/uncinatum 6-8.11.2009, Faculty Centre of Biodiversity, University of Vienna*. [S. l.: s. n., 2009?], str. [10]. [COBISS.SI-ID [2479014](#)]

GREBENC, Tine, MARTIN P., Maria, RATOŠA, Ivan, PILTAVER, Andrej, MARJANOVIĆ, Žaklina, BENUCCI, Niccolo G. M., KRAIGHER, Hojka. Molecular diversity in the genus Tuber indicates the correlation with the postglacial migration routes of their symbiont trees in W and E Europe. V: MEGUMI KASUYA, Maria Catarina (ur.), COSTA, Maurício Dutra (ur.). *Beyond the roots : abstracts [of the] ICOM 6, [held from] 9 to 14 August 2009, Belo Horizonte, Brazil*, str. 30. [COBISS.SI-ID [2464934](#)]

GREBENC, Tine, MARTIN P., Maria, RATOŠA, Ivan, PILTAVER, Andrej, MARJANOVIĆ, Žaklina, NICCOLO BENUCCI, Gian Maria, KRAIGHER, Hojka. A diversity of rDNA ITS region in the genus Tuber indicates the putative postglacial migration routes of their symbiont trees in W and E Europe. V: *The fungal cell : British mycological society annual scientific meeting : West Park, Dundee, 1st - 4th September 2009*. [S. l.]: British Mycological Society, cop. 2009, str. 38. [COBISS.SI-ID [2464422](#)]

BAJC, Marko, HRENKO, Melita, GREBENC, Tine, KRAIGHER, Hojka. Inferring phylogenies of ectomycorrhizal fungi exhibiting low similarities of their ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequences to respective fungal sequences deposited in molecular data bases. V: VERLIČ, Andrej (ur.), MALI, Boštjan (ur.), KRAIGHER, Hojka (ur.). *Book of abstracts and programme*. Ljubljana: Silva Slovenica, Slovenian Forestry Institute, 2010, str. 19. [COBISS.SI-ID [3000742](#)]

GREBENC, Tine, RATOŠA, Ivan, PILTAVER, Andrej, BENUCCI, Niccolo G. M., GLIŠIĆ, Aleksa, KARADELEV, Mitko, MARTIN P., Maria, KRAIGHER, Hojka, MARJANOVIĆ, Žaklina. The diversity and distribution of hypogeous fungi in the Balkan peninsula. V: *IMC9 : the biology of fungi : delegate CD-ROM*. [S. l.: s. n., 2010, [1 str.]

GREBENC, Tine, MARTIN P., Maria, RATOŠA, Ivan, SUZ, L. M., PILTAVER, Andrej, BENUCCI, Niccolo G. M., KRAIGHER, Hojka, MARJANOVIĆ, Žaklina. Postglacial migration of truffles in Europe. V: DOLENC KOCE, Jasna (ur.), VODNIK, Dominik (ur.), PONGRAC, Paula (ur.). 5. Slovenski simpozij o rastlinski biologiji z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 6.-9. september 2010 = 5th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation, Ljubljana, September 6.-9., 2010. *Knjiga povzetkov*. Ljubljana: Slovensko društvo za biologijo rastlin: = The Slovenian Society of Plant Biology, 2010, str. 38-39. [COBISS.SI-ID [2999718](#)]

### **1.16 Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji**

GREBENC, Tine, KRAIGHER, Hojka. Identification and quantification of ectomycorrhiza from field samples - a practical approach. V: CHAUHAN, Ashok K. (ur.), VARMA, Ajit (ur.). *A textbook of molecular biotechnology*. New Delhi; Bangalore: I. K. International Publishing House, cop. 2009, str. [1087]-1104, ilustr. [COBISS.SI-ID [2452902](#)]

### **1.17 Samostojni strokovni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji**

GREBENC, Tine, KRAIGHER, Hojka, MARTIN P., Maria, PILTAVER, Andrej, RATOŠA, Ivan. Research and cultivation of truffles in Slovenia : current status. V: CHEVALIER, Gérard (ur.). *La culture de la truffe : dans la monde*. [Brive-la-Gaillarde: INRA, 2008], str. 183-191, ilustr. [COBISS.SI-ID [2130342](#)]

### **2.12 Končno poročilo o rezultatih raziskav**

BOŽIČ, Gregor, VILHAR, Urša, URBANČIČ, Mihej, KOBAL, Milan, FERREIRA, Andreja, KRAIGHER, Hojka, GREBENC, Tine, SINJUR, Iztok, ŠTUPAR, Barbara, HRENKO, Melita, VERLIČ, Andrej, JARNI, Kristjan, BRUS, Robert, ČARNI, Andraž, ŠILC, Urban, KOŠIR, Petra, MARINŠEK, Aleksander, DAKSKOBLER, Igor. *Raziskave populacijsko genetskih in rastiščnih značilnosti avtohtonega črnega topola (Populus nigri L.) na obrežnih in poplavnih območjih ter usmerite za njegovo ohranitev = Population genetic studies and sites investigation of autochthonous European black poplar (Populus nigra L.) along river basins and floodplain forest areas in Slovenia and guidelines for its conservation : zaključno poročilo o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na projektu v okviru cilnega raziskovalnega programa (CRP) "Konkurenčnost Slovenije 2006-2012" : trajnostno gospodarjenje z gozdovi*. Ljubljana: Gozdarski inštitut Slovenije, 2008. 26 f. [COBISS.SI-ID [2331814](#)]

### **3.11 Radijski ali TV dogodek**

RATOŠA, Ivan, GREBENC, Tine, PILTAVER, Andrej. *Ljudje in zemlja : Gojenje tartufov v Sloveniji : TV prispevek v oddaji RTV Slovenija, TV Koper Capodistria, 2.12.2007*. Ljubljana: RTV Slovenija, TV Koper Capodistria, 2007. <http://www.rtv slo.si/media.php?id=9113644&mt=wm&mq=lo&wm=true&rm=true>. [COBISS.SI-ID [2136486](#)]

### **3.14 Predavanje na tuji univerzi**

GREBENC, Tine. *Identification and diversity assessment of native Tuber species from Slovenia compared to material from herbaria* : Madrid: Real Jardín Botánico-CSIC, [COBISS.SI-ID [1674150](#)]

### **3.15 Prispevek na konferenci brez natisa**

GREBENC, Tine. *Truffles in Slovenia : presented on the 1st International Truffle Festival of Brive (France), February 2nd and 3rd 2007*. Clermont-Ferrand: Institut National de la Recherche Agronomique, 2007. [COBISS.SI-ID [1859238](#)]

### 3.16 Vabljeno predavanje na konferenci brez natisa

GREBENC, Tine, MARTIN P., Maria, RATOŠA, Ivan, SUZ, L. M., PILTAVER, Andrej, BENUCCI, Niccolo G. M., KRAIGHER, Hojka, MARJANOVIĆ, Žaklina. *Postglacial migration of truffles in Europe : [presented at 5th Slovenian symposium on plant biology, Ljubljana, September 6-9, 2100]*. 2010. [COBISS.SI-ID [3009702](#)]

(Vir bibliografskih zapisov: Vzajemna baza podatkov COBISS.SI/COBIB.SI, 26. 10. 2010)

### 3.4 OSTALO

Delo na projektu je bilo na Gozdarskem inštitut Slovenije delno vpeto v vsebine, vezane na Programsko skupino P4—0107 (Gozdna biologija, ekologija in tehnologija) in na vsebine CRP projekta V4-0492 (Pomen gozdov za biotsko raznovrstnost na ekosistemski, vrstni in genski ravni v luči blaženja podnebnih sprememb in prilagoditve gospodarjenja z gozdovi glede na pričakovane spremembe). Partner z industrije je v času trajanja projekta izmenjeval znanja in se izpopolnjeval pri več neformalnih sodelavcih na področju Balkana in Italije.

### 4. MOREBITNI PROBLEMI/TEŽAVE PRI IZVAJANJU PROJEKTA

Izvajanje projekta v večji meri ni povzročalo težav nobenemu od sodelujočih partnerjev. V manjši meri se je kot nepraktičen izkazal sistem poročanja in financiranja, saj za čas od oddaje poročila (konec oktobra) do začetka naslednjega leta nismo mogli upravičiti morebitnih stroškov, nastalih na projektu.

Na koncu bi se vsi sodelujoči želeli zahvaliti osebju Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo, ki nam je bilo vedno na voljo za pomoč in nasvete.





