

e 403/A
INŠTITUT ZA GOZDNO IN LESNO GOSPODARSTVO
PRI BIOTEHNIŠKI FAKULTETI V LJUBLJANI

HOJKA KRAIGHER

RAZISKAVE MIKORIZE PRI
SMREKI V RAZLIČNO ONESNAŽENIH
OKOLJIH

RAZISKOVALNA NALOGA

LJUBLJANA, 1990

GDK in kjernekerede gley v malsop

e-403/1

INŠTITUT ZA GOZDNO IN LESNO GOSPODARSTVO
pri Biotehniški fakulteti v Ljubljani

Hojka KRAIGHER

RAZISKAVE MIKORIZE PRI SMREKI
V RAZLIČNO ONESNAŽENIH OKOLJIH

Raziskovalna naloga

Ljubljana, 1990



e-403/1/1991

Podatki o raziskovalcih:

Vodja naloge: Doc.dr.Franc Batič, dipl.biol.,
višji znanstveni sodelavec

Nalogo izdelala: Hojka Kraigher,
dipl.biol.,dipl.inž.goz.,
asistentka

Sodelavci:

J.Kalan
V.Mikulič
mag.D.Jurc
mag.A.Golob
I.Smole
M.Urbančič

T.Pridigar, TOZD gozd. Radlje
Dr.J.Titovšek, VTOZD za gozd.
Dr.N.Gogala, VTOZD za biol.
Dr.K.Drašlar, VTOZD za biol.
Dr.F.Lobnik, VTOZD za agron.
A.Piltaver, SO Šiška
S.Hočevar

Tehnični sodelavci:

J.Janša
J.Grzin

GDK 181.351 : 425.3 *Picea abies* Karst. (497.12)

IZVLEČEK

H.Kraigher (1990) Mikoriza pri smreki v različno onesnaženih okoljih. IGLG pri BF, Ljubljana. 54 str., 20 slik, 5 tabel, 3 priloge, 60 ref., sn, en (Raziskovalna naloga).

V prvi fazi raziskav mikorize pri smreki v različno onesnaženih okoljih je poudarek na razvoju osnovnih metodoloških pristopov pri terenskem in laboratorijskem delu. Osnovali smo zbirko 28-tih izolatov ektomikoriznih vrst gliv in nekatere od teh uporabili za poskuse umetne inokulacije semenk smreke. Od teh opisujemo mikorizo smreke z ektomikorizno glivo *Laccaria bicolor*. Začeli smo z zasledovanjem naravne mikorize pri sadikah in naravnem mladju smreke ter mikoriznega potenciala izbranih raziskovalnih ploskev, ki so različno intenzivno obremenjene z emisijami iz TE Šoštanj.

Ključna besede: ektomikoriza, identifikacija, izolacija, inokulacija, zračno onesnaževanje, smreka (*Picea abies* (L.) Karst.), Slovenija.

ABSTRACT

H.Kraigher (1990) Mycorrhiza on spruce in differently polluted environments. Inst. for Forest & Wood Economy, Ljubljana, 54 p., 20 pictures & graphs, 5 tabels, 3 append., 60 ref., sn, en (Research theme).

This first part of the research of mycorrhiza on spruce in differently polluted environments comprises the development of several methods and techniques for field and laboratory work. The collection of 28 different strains of several ectomycorrhizal fungi was established, some of which were used as inocula for *in vitro* inoculations. Out of these ectomycorrhiza of spruce with *Laccaria bicolor* is characterized. We started with mycorrhizal potential research and the research of naturally occurring ectomycorrhizas on spruce seedlings from differently polluted plots around Thermoenergetic Plant in Šoštanj.

II

Seznam slik	STRAN
Slika 1: Shematski prikaz zgradbe korenine	7
Slika 2: Mikorizna infekcijska cona	9
Slika 3: Razviti stadij ektomikorize pri smreki	10
Slika 4: Primer inokulacije semenk smreke v polsterilnih pogojih v petrijevi posodi	27
Slika 5: Naselitev gliv iz redu <i>Pezizales</i> na pladnje s predhodno sterilizirano podlago pri poskusu umetne inokulacije semenk smreke v nesterilnih pogojih v rastlinjaku	27
Slika 6: Skupna teža semenk smreke, teža nadzemnih poganjkov in teža korenin ob posameznih vzorčenjih.	28
Slika 7: Število kratkih korenin smreke v poskusu inokulacije semenk smreke v nesterilnih pogojih v pladnjih.	29
Slika 8: <i>Laccaria bicolor</i> . Trosnjak.	36
Slika 9: <i>Laccaria bicolor</i> . Skica mikorize.	36
Slika 10: <i>Laccaria bicolor</i> . Izhajajoče hife.	37
Slika 11: <i>Laccaria bicolor</i> . Površina plašča v 5 ravninah.	38
Slika 12: <i>Laccaria amethystina</i> . Mikorizna korenina smreke s poskusne ploskve na Velikem vrhu blizu Šoštanja.	39
Slika 13: <i>Xerocomus badius</i> .	40
Slika 14: <i>Piceirhiza nigra</i> .	40
Slika 15: <i>Xerocomus badius</i> . Rizomorf z odebeljeno centralno hifo.	41
Slika 16: <i>Xerocomus badius</i> . Centralna hifa rizomorfa s popolno razvitim septom.	41
Slika 17: <i>Thelephora terrestris</i> . Zunanja površina plašča s cistidiji.	42
Slika 18: <i>Lactarius</i> sp. Notranji sloji plašča z laticiferami, v katerih so vidne kapljice mlečka.	42
Slika 19: Prečni prerez neidentificirane mikorize.	43
Slika 20: Autofluorescenca istega prečnega prereza v UV svetlobi.	43

III

Seznam tabel

Tabela 1:	Vrste in izvor ektomikoriznih gliv v zbirki IGLG.	24
Tabela 2:	Razvitost mikorize pri umetni inokulaciji semenk smreke v nesterilnih pogojih v rastlinjaku.	30
Tabela 3:	Delež mikoriznih kkorenin (%M) pri sadikah smreke.	31
Tabela 4:	Splošni podatki o talnih vzorcih.	34
Tabela 5:	Analizni rezultati semenk smreke.	34

Seznam prilog

Priloga 1:	1) Mesečni popisni obrazec pri poskusu inokulacije semenk smreke z mikoriznimi glivami 2) Fotokopija semenk iz tega vzorčenja, gliva 039
Priloga 2:	Popisni obrazec pri analizah skupnega deleža mikorize sadik smreke iz Mislinjskega jarka z naslovom : Mikoriznost
Priloga 3:	1) Obrazec 3: Mikorizni potencial rastišč 2) Osnove in navodila za analize mikoriznega potenciala rastišč

KAZALO	STRAN
IZVLEČEK - ABSTRACT	I
Seznam slik	II
Seznam tabel	III
Seznam prilog	III
1. UVOD	1
1.1 Splošni uvod v problematiko	1
1.2 Mikoriza in vplivi onesnaževalcev nanjo	1
1.3 Namen raziskave	4
2. KORENINE IN EKTOMIKORIZA PRI SMREKI	4
2.1 Razporeditev, struktura in funkcija korenin	4
2.2 Spoznavanje partnerjev in razvoj mikorize	8
2.3 Identifikacija in karakterizacija ektomikorize	13
<u>2.3.1 Metode identifikacije ektomikoriznega partnerja</u>	13
<u>2.3.2 Morfološke in anatomske značilnosti ektomikorize</u>	15
<u>2.3.3 Poimenovanje ektomikorize</u>	18
3. MATERIAL IN METODE DELA	19
3.1 Izolacija in gojenje ektomikoriznih gliv	19
3.2 Umetna inokulacija semenk smreke	20
3.3 Metode terenskega dela	21
3.4 Analize mikorize	22
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	24
4.1 Zbirka ektomikoriznih gliv	24
4.2 Umetna inokulacija semenk smreke	25
4.3 Primerjalna analiza mikoriznih sadik smreke s poskusnih ploskev v Zavodnjah, Mislinjskem jarku in v Ljubljani	31
4.4 Naravno mladje smreke in mikorizni potencial organskih horizontov tal petih ploskev v okolici TE Šoštanj	33
4.5 Identifikacija in karakterizacija posameznih tipov mikorize	36
5. UGOTOVITVE	45
6. POVZETEK	47
7. SUMMARY	48
8. LITERATURA	50
Priloge	

1. UVOD

1.1 Splošni uvod v problematiko

Propadanje gozdov je v zadnjih letih poudarilo potrebe po poglobljenem poznavanju in proučevanju fiziologije gozdnih drevesnih vrst in njihovih simbiotov. Simptomi propadanja, ki se navadno pokažejo pri odraslem drevju, so klorotičnost in prezgodnje odpadanje listja in iglic, nenormalna in zmanjšana rast ter poškodovanost kratkih korenin in mikorize, spremembe v rasti poganjkov, zmanjšana debelinska rast, večja pogostost pojavljanja boleznin in škodljivcev (Schutt, 1984).

Količina in sestava zračnih onesnaževalcev se spreminja z geografsko lego, zato so v posameznih regijah v severnem zmernem in borealnem pasu gozdov posamezne raziskovalne skupine razvile več hipotez o vzrokih propadanja, npr. hipoteza stresa, amonijeva hipoteza, interakcije ozona in fotooksidativnega smoga, zakisovanje tal zaradi kislih padavin, virusne idr. bolezni (Blank, Roberts, Skeffington, 1988). Na fiziološko oslABLJENE rastline vpliva vrsta biotskih in abiotskih faktorjev v okolju, npr. svetloba, temperatura, dostopnost vode in hranilnih elementov, in interakcije s patogenimi in simbiotskimi organizmi (McCool, 1988).

Prisotnost simbiotskih organizmov, npr. mikoriznih gliv, lahko bistveno vpliva na odzivanje rastline na dejavnike okolja in okolje lahko vpliva na sposobnost mikoriznih gliv za združevanje z višjimi rastlinami. Onesnaževalci lahko vplivajo neposredno na sposobnost mikoriznih gliv za inokulacijo, ali posredno z vplivi na višjo rastlino (ibid.). Zato so nujne vzporedne raziskave fiziologije mikoriznih gliv samih in v simbiozi, ter vplivov posameznih onesnaževalcev na mikorizo.

1.2 Mikoriza in vplivi onesnaževalcev nanjo

Mikorizo je kot simbiozo med glivo in korenino višje rastline prvi opisal in poimenoval Frank leta 1885, kot 'glivno korenino, ki deluje kot organ za sprejem vode in hranilnih elementov'. Opazoval je boljšo rast mikoriznih borov v primerjavi z nemikoriznimi (Frank, 1985). Ločil je ektotrofno mikorizo (danes ektomikorizo), za katero sta značilna glivni plašč okoli korenine in t.i. Hartigova mreža, kjer hife prepletajo prostore med celicami primarne skorje; in endotrofno mikorizo (danes endomikorizo), kjer hife prodirajo v celice primarne skorje. Pri

smreki, ki predstavlja v Sloveniji eno od poglobitnih gospodarskih gozdnih drevesnih vrst, je razvita predvsem ektomikoriza (Nylund, Unestam, 1982).

V naravnih, neonesnaženih pogojih, je mikoriza razvita pri večini taksonov višjih rastlin (Tester, Smith & Smith, 1987), od tega je ca. 3% rastlin, predvsem gozdnih drevesnih vrst, ektomikoriznih (Meyer, 1973). Ektomikorizo tvorijo predvsem glive iz razredov Basidiomycotina, Ascomycotina, nekaj gliv iz razreda Zygomycotina in Fungi Imperfecti (Trappe, 1962; Harley & Harley, 1987). Med gozdnim drevjem z razvito ektomikorizo pa omenimo predvsem večino golosemenk (Gymnospermae), predvsem družino Pinaceae, in nekaj kritosemenk (Angiospermae), predvsem družine Fagaceae, Betulaceae, Aceraceae idr. (Harley & Harley, 1987).

Pri mikorizni korenini se poveča predvsem dostopnost hranilnih elementov, izboljša se ji vodni režim, dolgoživost korenin in odpornost pred vdorom patogenov; posamezne vrste gliv so sposobne kopičenja ionov toksičnih težkih kovin (Harley, Smith, 1983). Mikorizne glive sprejemajo energijo od višje rastline v obliki ogljikovih spojin (Hacsckaylo, 1973). Zato lahko vsi zunanji dejavniki okolja, ki vplivajo na fotosintezo in razporeditev asimilatov v rastlini, hkrati vplivajo na fiziološke spremembe mikorizne simbioze (McCool, 1988). V rastlini se asimilati premeščajo iz listov v korenine in od tod kot organski eksudati v rizosfero. Izločki korenin stimulirajo mikrobo aktivnost v okoliških tleh, kar privede do pospešene topnosti mineralnih hranil. Na kvaliteto in kvantiteto koreninskih eksudatov pa vplivajo rastlinska vrsta, starost in mineralna prehranjenost, kemijske in fizikalne lastnosti tal, npr. temperatura, svetloba, vlažnost tal, poškodovanost korenin in prisotnost mikroorganizmov v tleh (Curl, Truelove, 1985).

Zračni onesnaževalci vplivajo na manjši pretok asimilatov v korenine in lahko s tem modificirajo procese v koreninah in odnose med mikroorganizmi v rizosferi, vključno z mikoriznimi glivami. Reich *et al.* (1985) so opazovali vplive ozona in SO₂ na mikoriznost semenk rdečega hrasta. Medtem ko ozon sam ni vplival na delež mikoriznih korenin, so kombinacije O₃ in SO₂ zaviralno vplivale na tvorbo oziroma na število mikoriznih kratkih korenin. Garrett, Hedrick in Carney (1982) so ob isti kombinaciji onesnaževalcev merili respiracijo ektomikoriznih gliv in segmentov mikoriznih korenin bora. Sprejem kisika je bil zmanjšan v primeru mikoriznih in nemikoriznih korenin, vendar so bile ektomikorizne korenine bolj rezistentne na negativne vplive onesnaževalcev. Sklepali so, da mikorizna simbioza zagotavlja do neke mere zaščitno vlogo pred poškodbami kratkih korenin z O₃ in SO₂.

Reich *et al.* (1985) so opazovali tudi vplive kislih padavin na rdeči hrast. Višanje kislosti padavin je zaviralno vplivalo na mikoriznost korenin, vendar le, če je bil pH padavin nižji od pH tal. Nižanje pH padavin do pH 3.0 je vplivalo na zmanjšanje deleža mikoriznih korenin in na zmanjšanje števila mikoriznih korenin na enoto dolžine korenin. Podobne rezultate navajata Stroo in Alexander (1985) v tleh, predhodno razkuženih s paro. Pri netretiranih tleh te padavine niso vplivale na gostoto in potencial inokuluma mikoriznih gliv.

Kislost padavin in delež mikorize lahko ponazori odvisnost v obliki polinoma druge stopnje: Shafer *et al.* (1985) so zabeležili največji delež mikorize pri padavinah s pH 2.4, srednje vrednosti aplikiranih kislih padavin (pH 3.2 in 4.0) pa so zaviralno vplivale na tvorbo mikorize. Dolgotrajno zakisanje podlage pa bi verjetno enako zaviralno vplivalo na mikorizo.

Povzamemo lahko, da je odziv rastline na onesnaževalce in druge abiotske dejavnike v okolju, odvisen od cele vrste dejavnikov, tako temperature, svetlobe, vode in hranil. Prisotnost in efektivnost mikoriznih gliv in drugih mikroorganizmov v mikorizosferi lahko sovpliva z nekaterimi teh dejavnikov in spremeni rastni odziv rastline. Ker je vsak rastlinski sistem edinstven, pa lahko pričakujemo celo vrsto odgovorov na polucijski stres (McCool, 1988).

Delovanje onesnaževalcev na rastline vpliva na različne metabolne procese, predvsem na 'source-sink' razmerja in razporeditev asimilatov v rastlini. Dejavniki, ki vplivajo na dostopnost le-teh koreninam, vplivajo na uspešnost simbiotskih mikroorganizmov. Tako ozon, SO₂ in kisle padavine vplivajo na simbiozo posredno preko sprememb v metabolizmu višje rastline in neposredno z vplivanjem na kemijo tal.

Z onesnaževanjem se spreminja vrstna sestava in frekvenca višjih gliv (Arnolds, 1988). V bolj onesnaženih področjih posamezne mikorizne glive izginjajo, vse bolj se širijo razne saprofitske in parazitske glive. Tako npr. Fellner (1989) predlaga vrsto *Russula mustelina* kot primerno bioindikacijsko vrsto, saj je v zadnjem desetletju izginila in najbolj onesnaženih predelov v čeških Krkonoših. Vendar taka bioindikacija nosi v sebi veliko možnosti napačnih interpretacij: na pojavljanje sporokarpov namreč vpliva celoten sklop klimatskih dejavnikov v posameznem letu, na zasledovanje njihovega pojavljanja pa pogostost obiskovanja in popisovanja gliv na vzorčnih ploskvah. Zato cela vrsta raziskovalcev predlaga drugačno bioindikacijo z mikoriznimi glivami: glive v ektomikorizni simbiozi so v posameznih rastiščih

stalno prisotne, njihova vitalnost in vrstna sestava pa sta neposredno odvisni od onesnaževanja. Zato bi bilo primerno razviti metodo bioindikacije onesnaženosti rastišč z raziskavami ekto-mikorize (Sklepi Delovne skupine za kartiranje makromicet, Regensburg, 1990, pers. comm.).

1.3 Namen raziskave

V naših raziskavah želimo spoznati sposobnost nekaterih mikoriznih gliv za razvoj simbioze s smreko v odvisnosti od posameznih pogojev okolja s posebnim poudarkom na vplivih onesnaževanja; spoznati poglobitve domače vrste gliv pri smreki v posameznih okoljih; njihove morfološke in fiziološke značilnosti v posameznih stadijih razvoja mikorize; nekatere osnovne mehanizme, ki uravnavajo odnose med partnerjema; ter postopno preiti na izbiro vrst in sojev gliv, ki bi bile sposobne preživeti v simbiozi in pozitivno vplivati na smreko v določenih toksičnih pogojih v okolju.

Poudarek prve faze raziskav je na razvoju osnovnih metodoloških pristopov pri terenskem in laboratorijskem delu, zasledovanju naravne mikoriznosti sadik in mladja smreke na terenu v različnih pogojih onesnaževanja ter umetnega gojenja mikoriznih gliv in inokulacije semenk smreke v laboratorijskih pogojih.

2. KORENINE IN EKTOMIKORIZA PRI SMREKI

2.1 Razporeditev, struktura in funkcija korenin

Korenine omogočajo gozdnemu drevju sidranje v tleh, sprejem vode in hranil ter interakcije z rizosfero. Rast in razvoj korenin sta odvisna od dednih lastnosti rastlin in vplivov okolja. Najbolj splošna razdelitev loči drevesne vrste z razločno glavno korenino, s srčastim koreninskim sistemom in vrste s površinsko razraslimi koreninami, od katerih izraščajo navpične globinske korenine, kot npr. pri smreki. Površinski koreninski sistemi se lahko razraščajo v radiju čez 20m okrog drevesa (Lyford, 1975). Na to razdelitev vplivajo v veliki meri kemične, fizikalne lastnosti, npr. struktura in tekstura, zračnost in vlažnost tal, talna temperatura, talni organizmi ter kompeticija in interakcije med koreninami v tleh.

Primarna korenina se razvije iz radikule embrija. Pri večini golosemenk in dvokaličnic raste skozi vso življenjsko dobo rastline in preide v sekundarno debelinsko rast (Curl, Truelove, 1985). Pri enokaličnicah pa praviloma propade, namesto nje se razvijejo nadomestne korenine, ki tvorijo šopasti koreninski sistem.

Koreninski sistem iglavcev je več avtorjev skušalo razdeliti v pionirske, dolge lateralne in kratke (lateralne) korenine, glede na njihovo hitrost rasti, način vejanja in izgled apikalnega meristema (Wilson, 1975). Dolga korenina iglavcev se praviloma racemozno veja in je sposobna neomejene rasti. Hitrost rasti je značilno večja, čas rasti pa daljši kot pri kratkih koreninah. Vendar spremembe v okolju lahko povzročijo prehod značilnosti rasti dolge korenine v kratko in obratno (Marks, Foster, 1973).

Struktura apikalnega meristema aktivne dolge korenine izraža povečano zmožnost za rast. Meristem je koničen in večjega premera v primerjavi z manjšim, bolj polkrožno oblikovanim meristemom kratke korenine (ibid.). Vejanje stranskih korenin je odvisno od aktivnosti apikalnega meristema. Pri hitro rastočih dolgih koreninah je lateralno vejanje pogosto zavrto, medtem ko tanjše, hierarhično nižje korenine lahko producirajo večje število stranskih korenin še nižjega reda, s tem, da se zavre rast apikalnega meristema materinske korenine (ibid.).

V času aktivne rasti je pri dolgi korenini opazna večja cona belo obarvanega tkiva za koreninskim vršičkom kot pri kratkih koreninah. Proti koncu vegetacijske dobe se ta cona zmanjša, v času dormance korenine pa je prekrita s slojem metakutisa (ibid.).

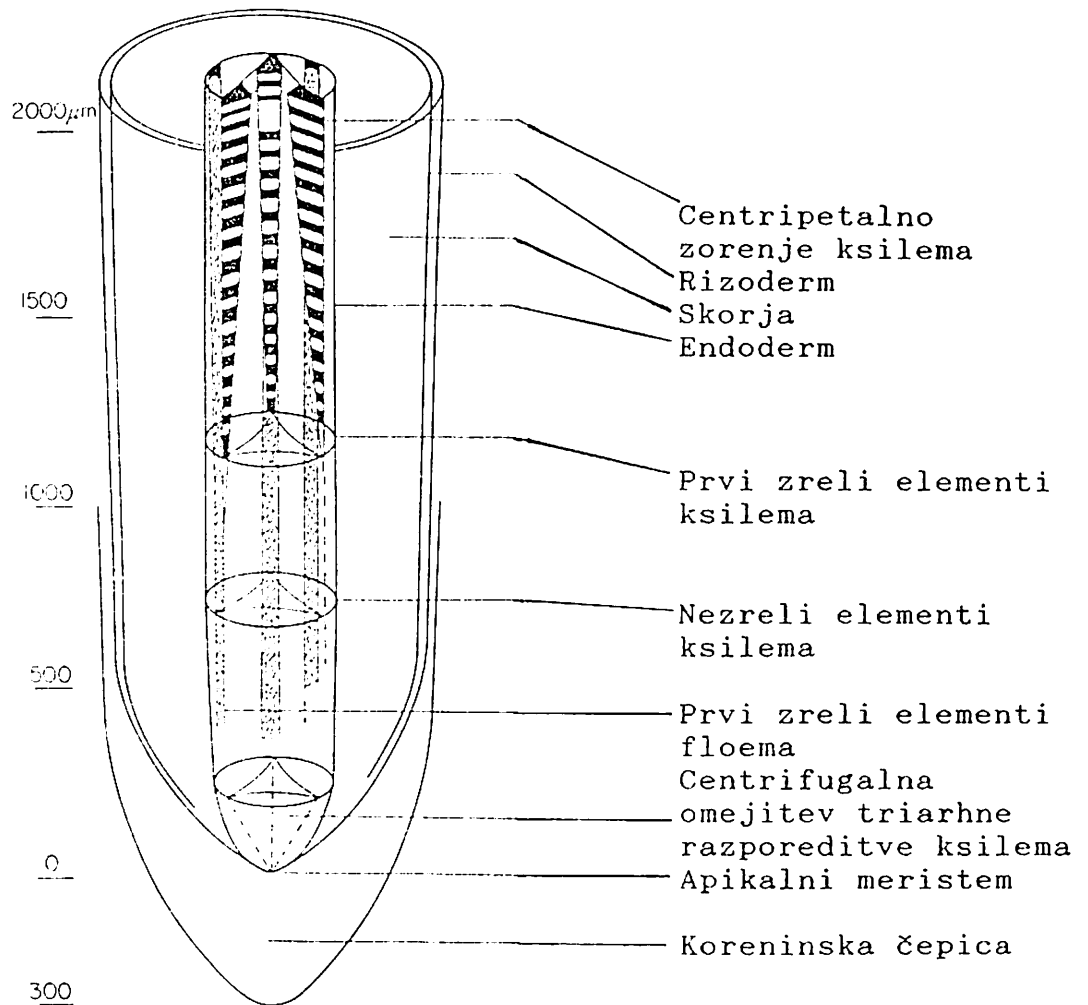
Za mlade nemikorizne korenine iglavcev so značilni globoko vsajeni koreninski laski, ki s staranjem korenine izginejo (Marks, Foster, 1973). Normalno imajo celice skorje tenko celično steno, so podobnih izmer in lahko različnih oblik. S staranjem se te celice podaljšajo in porjavijo (ibid.). Pri starejših koreninah lahko primarna skorja ostane dlje časa na korenini kot obroč, preden izgine.

Staranje skorje je povezano s staranjem endodermisa, ko celice oplutenijo in celične stene odebelijo. Ko korenina preneha rasti, se sekundarni endodermis razširi do koreninskega vršička in večina celic primarne skorje odmre (ibid.).

Za boljše razumevanje ponavljamo osnovno zgradbo korenine (Slika 1): **apikalni meristem** je področje aktivne delitve celic in rasti korenine; pri koreninah ga na distalnem koncu korenine prekriva **koreninska čepica**, sestavljena iz živih parenhimatskih celic, ki ščitijo meristematsko tkivo zadaj in hkrati uravnavajo gravitropično rast korenine; koreninski vršički so navadno vse do cone, kjer izraščajo koreninski laski, prekriti z granularnim, delno fibrilarnim mucilaginoznim plaščem, imenovanim mucigel; hipoteze o njegovi funkciji predvidevajo zaščito koreninskih vršičkov pred mehanskimi poškodbami v tleh, pred izsušitvijo in vlogo pri sprejemu hranil; za cono delitve celic sledita coni determinacije in diferenciacije; v slednji nastopajo koreninski laski, izrastki celic rizodermissa, ki povečujejo površino korenine; rizodermis je navadno enoceličen zunanji sloj celic; celice primarne skorje navadno sestavljajo radialno koncentrični sloji parenhimatskih celic s tanko steno; v njih so lahko shranjene razne rezervne in zaščitne substance; notranji enojni sloj celic skorje, **endodermis**, omejuje proti notranjosti vaskularni cilindri, sestavljen iz floema, ksilema in pridruženega parenhimatskega tkiva; celice endoderma so lahko podaljšane in karakterizirane s **Kasparijevim trakom**, slojem lignina in suberina, ki impregnirata v obliki traku del radialne celične stene in obkrožata celico; tik pod endodermisom je en ali več slojev parenhimatskih celic, ki tvorijo **pericikel**, predel z močno meristematsko aktivnostjo; od tod izvirajo primordiji lateralnih korenin, felogen, meristem, iz katerega se razvije pluta, ter del vaskularnega kambija, iz katerega se razvijeta sekundarni ksilem in floem; pri lesnatih rastlinah preidejo korenine v sekundarno rast (debelitev); iz nediferenciranih prokambijevih celic, ki ležijo med floemom in ksilemom se tvori **vaskularni kambij**; ta področja kambialne aktivnosti kmalu povežejo medseboj pasovi kambija iz pericikla na zunanji strani protoksilema; povezani vaskularni kambij kmalu preide v periklinalne delitve celic, ki se proti notranjosti diferencirajo v sekundarni ksilem in proti zunanosti v sekundarni floem; hkrati lahko pride do delitve drugih celic v periciklu, felogena ali kambija plute, ki omejijo celice plute (felem) proti zunanosti in zarodne plasti kambija (feloderm) proti notranosti; povečani premer korenine ima navadno za posledico raztrganje primarnih tkiv proti zunanosti (endoderma, skorje, rizoderma), ki se postopno odluščijo od korenine (vse po: Curl, Truelove, 1985).

Korenine sprejemajo vodo z raztopino mineralnih hranil iz prostorsko zelo omejene okolne talne raztopine. Maksimalna absorbcija vključuje cono koreninskih laskov (ibid.). Sprejem ionov pogojuje kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) v 'prostem prostoru' korenin. Ta vključuje apoplast, t.j. del korenine, kjer se ioni lahko relativno hitro izmenjujejo in ne zajema prehoda skozi membrano celice, ter zunanji mucigel okoli korenin, negativno nabiti, hidratirani polisaharid (Haynes, 1980). Predvidevajo, da je CEC korenin eden osnovnih selektorjev, ki kontrolirajo

mineralno sestavo rastline. Absorbcija ionov s koreninami zajema predvsem dve stopnji: pasivni transport skozi večino koreninskega prostega prostora in aktivni transport skozi plazmalemo celic rizoderma, skorje in endoderma (ibid.). Transport po apoplastu lahko poteka vse do Kasparijevega traku, kjer je nujen aktivni prehod v simplast, po prehodu traku pa lahko ponovno preidejo v prosti prostor celičnih sten (ibid.).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe korenine (po: Nye & Tinker, 1977).

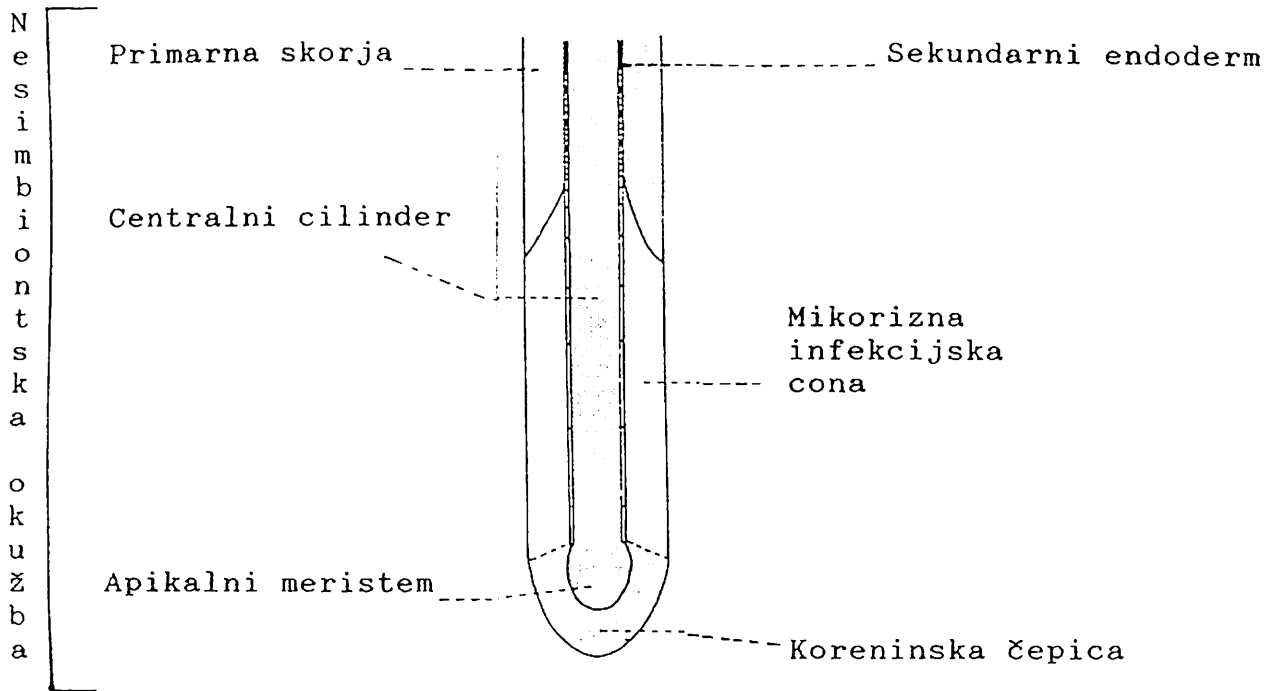
2.2 Spoznavanje partnerjev in razvoj ektomikorize

Pri spoznavanju partnerjev v mikorizni simbiozi, naselitvi hif na koreninah višje rastline in regulaciji odnosov med partnerjema predvidevajo značilno vlogo koreninskih eksudatov in rastlinskih rastnih substanc, predvsem hormonov, ki jih tvorita oba partnerja v simbiozi (Barea, 1986). Inicijacija naselitve korenin s hifami gliv je predvidoma odvisna predvsem od metabolitov v koreninah višje rastline (Nylund, Unestam, 1982). Proces se začne s kalitvijo ali aktivacijo propagulov (spor ali hif) gliv, ki žive blizu korenin višje rastline. Možne simbiote stimulirajo substance, ki jih sproščajo korenine gostitelja. Le ektomikorizne glive so sposobne signal prepoznati. Stimulacija gliv s koreninskimi eksudati je v veliki meri odvisna od vrste glive, vendar okolna rizosfera to specifičnost lahko modificira (Barea, 1986).

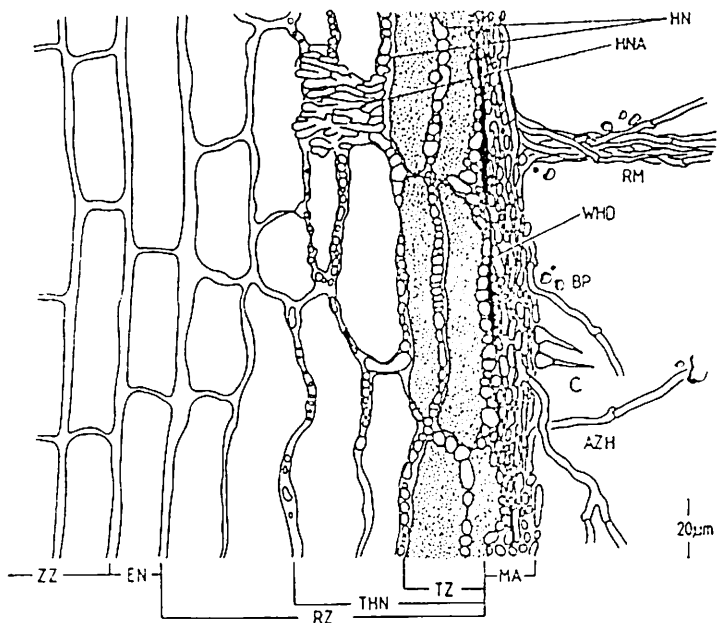
Efekt koreninskih eksudatov so poimenovali M-faktor (Melin, 1962). Sestava tega faktorja ni povsem razjasnjena, dokazane so bile substance s citokininsko aktivnostjo in prekursorji avksinov (Gogala, 1971; Fortin, 1970). Vendar *in vitro* ektomikorizne glive za svojo rast ne potrebujejo nobene od teh substanc (Harley, Smith, 1983).

Tudi mikorizne glive lahko tvorijo fiziološko aktivne substance, npr. avksine, citokinine, etilen, gibereline (Gay, 1988). V simbiozi so te substance študirali doslej predvsem pri VA-mikorizi (npr. Dixon, Garrett, Cox, 1988), medtem ko je bila večina študij pri ektomikoriznih glivah opravljena v čistih kulturah teh gliv (pregled v Greene, 1980). Na tvorbo hormonov pri ektomikoriznih glivah imajo znaten vpliv mikroorganizmi v mikorizosferi (Strzelczyk, Kampert, 1987).

Do naselitve korenine z mikoriznimi glivami lahko pride le v omejenem področju, subapikalno, za koreninskim meristemom, le pri živih celicah primarne skorje. Hife lahko vdrejo le v tkivo, ki je v fiziološkem stanju izgradnje celične stene in zorenja celic (Gianinazzi-Pearson, 1984). To cono (Slika 2) sta Marks in Foster (1973) poimenovala 'mikorizno infekcijsko zono' (MIZ). MIZ potuje akropetalno hkrati z rastjo korenine, velikost in čas dostopnosti te cone za hife mikoriznih gliv sta odvisna od hitrosti rasti korenine in morfogeneze tkiva. Hitro rastočih korenin mikorizne glive navadno ne inficirajo (ibid.). Torej je proces infekcije posredno odvisen tudi od dejavnikov v okolju, ki vplivajo na hitrost rasti korenin (ibid.).



Slika 2: Mikorizna infekcijska cona (po: Marks, Foster, 1972)



Slika 3: Razviti stadij ektomikorize pri smreki (po: Gronbach, 1988); HN - Hartigova mreža; HNA - površina Hartigove mreže, RM - rizomorf; WHD - površinski derivati korenine; BP - talni delec; C - cistidij; AZH - izhajajoče hife; ZZ - centralni cilindar; EN - endodermis; RZ - celice skorje; THN - globina Hartigove mreže; TZ - taninske celice; MA - plašč.

Pogoj za vdor hif v korenino gostitelja je tvorba rahle hifne ovojnice okoli korenine (Nylund, Unestam, 1982). Iz te vrastejo posamezne hife v korenino. Pri tem verjetno predvsem mehansko razmaknejo osrednjo lamelo med celicami primarne skorje, ki so fiziološko in strukturno prilagojene na možnost vdora simbiotskih hif, ker njihove celične stene vsebujejo veliko pektinskih substanc, ki povečujejo fleksibilnost samih celičnih sten (Nylund, 1987). Tako MIZ omejujejo tkiva, kjer so celične stene trdneje povezane medseboj, ter staranje in odmiranje celic skorje, ko prihaja dodatno do tekmovanja s saprofiti za isto nišo (ibid.).

Po vdoru v korenino se hife glive morfološko in fiziološko spremenijo, medtem ko tkiva gostitelja ne kažejo specifičnih sprememb. Hife se postopno razrastejo v vrstno specifično oblikovan labirint hif med celicami primarne skorje, imenovan Hartigova mreža. Labirintna oblika rasti se prenese na površino korenine in tvori bolj ali manj debel plašč, ki lahko pri počasneje rastočih koreninah prekrije koreninski vršiček (Nylund, Unestam, 1982; Kottke, Oberwinkler, 1986).

V polno razvitem stadiju mikorize (Slika 3) živi sistem hif povsem ovije žive celice primarne skorje (Kottke, Oberwinkler, 1986). V tem razvojnem stadiju celične stene niso več natanko ločljive, izgubljajo identiteto in se težje ločijo od vmesnega matriksa. V fiziološko aktivni fazi niso opazni vmesni prostori med hifami in celično steno (Kottke, Oberwinkler, 1986). Elektronska gostota matriksa in celične stene pa je odvisna tako od razvojnega stadija kot od vrste glivnega simbionta (ibid.). Šele v tem stadiju, potem ko je glivni plašč popolno razvit, je opazna hipertrofija celic koreninske skorje (Nylund, Unestam, 1982).

Pri glivnem partnerju začne ob staranju odmirati najprej hifni plašč, ki ga naseljujejo razni saprofitski organizmi. Hkrati se začno procesi staranja v zunanjih celicah skorje. Potem, ko te celice odmrejo, je bil pogosto opažen vdor hif Hartigove mreže v notranjost celic (Kottke, Oberwinkler, 1986).

Stadij dormance označuje sloj metakutisa, ki se stvori s suberizacijo celičnih sten in akumulacijo polifenolov v celicah koreninske čepice in malih celic med endodermom in koreninsko čepico (ibid.). Tako je apikalni meristem obkrožen z zaščitnim slojem in mikorizne glive so ograjene od meristema med dormanco.

Ponovni začetek rasti mikorize je lahko počasen. V tem primeru koreninski vršiček ne predre glivnega plašča ampak korenina in gliva skupaj počasi rasteta (Harley, Smith, 1983). Hartigova mreža sledi rasti še počasneje in navadno po ponovnem prenehanju rasti zraste vse do naslednjega sloja metakutisa (Kottke, Oberwinkler, 1986).

Če je ponovna rast korenin hitra, pa korenina predre glivni plašč. V tem primeru lahko pride do ponovne mikorizacije korenine z drugo vrsto glive. Ta stadij je primerljiv s primarno infekcijo korenin. Razvoj mikorize lahko poteka na tri načine: rasti korenine lahko najprej sledi rast plašča, šele nato tudi Hartigove mreže, lahko je rast obeh simultana, ali pa najprej zraste Hartigova mreža in tej sledi plašč (Kottke, Oberwinkler, 1986; Nylund, Unestam, 1982).

Med posameznimi strukturami ektomikorize so procese staranja opazovali predvsem pri Hartigovi mreži. Notranji sloj celic primarne skorje je v fazi staranja mikorize še vedno prekrit z ozkimi prstasto deljenimi hifami, ki so medsebojno v tesnem kontaktu. Hife v zunanjih slojih celic pa so povečane in ločene druga od druge. Isti proces je opazen od distalnega proti proksimalnemu koncu Hartigove mreže (Kottke, Oberwinkler, 1986).

Ontogenetske spremembe Hartigove mreže so navadno povezane s staranjem celic skorje. V fiziološko aktivnem stadiju ektomikorize sta hifa in celična stena celice skorje v tesnem kontaktu. V starejših stadijih pa je med obema viden granularni ali gost matriks (Kottke, Oberwinkler, 1986).

Al Abras *et al.* (1988) opisujejo naslednje morfološko in anatomsko različne cone mikorizne korenine, kjer je mikorizo s smreko verjetno tvorila gliva iz rodu *Hebeloma*: 1) nemikorizne koreninske vršičke korenin, vedno bele barve; 2) nemikorizne dele korenin, rjave barve; 3) mlade stadije mikorize, stare 2 do 3 mesece, z belim plaščem; 4) rjavo cono 4 do 6 mesecev stare mikorize - rjava barva je verjetno posledica taninov v celicah gostitelja, možno kot reakcija na glivo; 5) enoletna in za njo, 6) dveletna mikoriza, ki je bila vedno rjave barve in brez plašča. Coni eno- in dveletne mikorize je vedno obkrožal rahel micelij, ki je rasel sem iz mlajših con mikorize. Edina morfološka razlika med mladimi in starimi razvojnimi stadiji je bila odsotnost plašča in ekstramatričnih hif.

2.3 Identifikacija in karakterizacija ektomikorize

Funkcionalna kompatibilnost posameznih vrst in sojev gliv v mikorizni simbiozi se lahko razlikuje glede na fiziološke lastnosti glive ali določene populacije višje rastline (Gianinazzi-Pearson, 1984). V praksi nekateri soji določenih vrst gliv bolj pripomorejo k boljši rasti višje rastline v določenem okolju. Hkrati se vrstna sestava mikoriznih gliv v zadnjih desetletjih spreminja pod vplivi onesnaževanja (Arnolds, 1988), torej so posamezne vrste in soji gliv različno sposobni preživetja pod vplivi posameznih onesnaževalcev. Ti vzroki so danes pglavlitni razlog za nujnost identifikacije mikorize v naravnih, različno onesnaženih gozdnih ekosistemih.

Posamezni poskusi klasifikacije ektomikorize so poznani od leta 1927 dalje, ko je Melin razporejal ektomikorizo po habitusu (cit. v Zak, 1971). Dominik (1956) je razporedil 12 podtipov ektomikorize v 8 rodov (ibid.), glede na razne anatomske značilnosti, npr. obliko plašča. Vendar se nobena od teh klasifikacij ni obdržala, ker sta preveč splošni, ne identificirata glivnega, niti rastlinskega partnerja, niti mikorize.

2.3.1 Metode identifikacije ektomikoriznega partnerja

Za identifikacijo mikorizne glive s posameznim partnerjem so predpisane naslednje metode (Zak, 1973):

1. Umetna inokulacija semenk *in vitro* - Sterilizirana semena kalijo v sterilnih pogojih ob prisotnosti glivnega micelija, izoliranega iz sporokarpa posamezne testne glive. V nekaj mesecih je teoretično možno opaziti in opisati ektomikorizo, ki jo tvorita uporabljena gliva in posamezna drevesna vrsta. V ta namen je bilo razvitih več metod inokulacije in gojenja glive in semenk. Vendar, če inokulacija uspe, se mikoriza navadno morfološko razlikuje od tiste v naravnih pogojih. Ta metoda je nujna za pozitivno determinacijo mikoriznih gliv s posamezno drevesno vrsto, neuspešna pa je predvsem pri glivah, ki nastopajo kot mikorizne v starejših stadijih razvoja gozdnih drevesnih vrst (Last, Dighton, Mason, 1987).

2. Izolacija glive iz mikorize - Koščke mikoriznih korenin se površinsko sterilizira in položi na sterilno gojišče. Micelij, ki zraste iz ektomikorize se nato primerja z morfološkimi in

anatomskimi značilnostmi micelijev, izoliranih iz sporokarpov. Ta metoda je omejena na tiste mikorizne glive, ki so sposobne rasti na umetnih medijih, in niso preveč fenotipsko variabilne. Tudi pri tej metodi je nujna dodatna umetna inokulacija korenin semenk *in vitro* kot dokaz vitalnosti inokuluma.

3. **Zasledovanje rizomorfov in hif v tleh** - Za posamezne tipe ektomikorize je značilna tvorba rizomorfov, neke vrste translokacijskih organov gliv, ki lahko povezujejo sporokarpe gliv in mikorizne korenine med seboj. Tako zasledovanje je najlažje izvesti, če dotične vrste gliv avtofluorescirajo ob osvetlitvi z UV svetlobo, ali z radioaktivnim markiranjem (,ki pa onesnažuje okolje). Mikorizno korenino je potrebno dodatno mikroskopsko analizirati, ker podobne rizomorfe, ki se zgolj površinsko dotikajo korenine, tvori cela vrsta saprofitskih in parazitskih gliv.

4. **Neposredna povezava sporokarpa z mikorizo pod njim** - Ta metoda je danes največ v uporabi. V bližnji okolici sporokarpa potencialno mikorizne glive se izkoplje talni vzorec in se v njem z binokularjem in mikroskopom opazuje povezave in značilnosti micelija sporokarpa in rizomorfov z glivnimi tkivi mikorize pod sporokarpom. Ta metoda zagotavlja zanesljivo in sprotno identifikacijo naravne ektomikorize, možno jo je aplicirati za vsako naravno okolje in ne zahteva gojenja in umetne inokulacije korenin. Odvisna je izključno od pojavljanja sporokarpov.

Potek identifikacije mikorize poteka navadno z aplikacijo vseh naštetih metod (primer po: Zak, 1971):

- 1) opazovanje sporokarpov, povezanih z mikorizo z rizomorfi;
- 2) opazovanje značilnosti micelija pod sporokarpom v primerjavi z micelijem v mikorizi;
- 3) primerjava značilnosti rizomorfov, ki izhajajo iz mikorize s tistimi, ki izhajajo iz sporokarpov;
- 4) primerjava gojenega micelija gliv, izoliranega iz mikorize v primerjavi z izoliranim iz trosnjakov;
- 5) uspešna umetna inokulacija posamezne glive in semenke določene drevesne vrste.

Našteta metodika je zamudna, umetne inokulacije so pogosto neuspešne, morfologija je lahko neustrezna, lahko pa tudi v naravi saprofitske glive v umetnih pogojih spremenijo značaj v simbiotskega ali obratno. Zato večina navedb mikoriznih gliv izhaja iz sklepanja o mikoriznosti le-teh in ne iz eksperimenta, npr. klasični članek Trappe-ja (1962), zbirni članek o mikorizi na Britaneksm otočju (Harley & Harley, 1987), raziskave mikoriznih gliv petigličastih borov v Jugoslaviji (Tortić, 1987) itd. Poenoteni ključ za identifikacijo ektomikorize, ki izhaja iz naštetih dokazov mikoriznosti, pa izhaja šele od leta 1987 dalje (Agerer, 1987 - 1990).

2.3.2 Morfološke in anatomske značilnosti ektomikorize

Pri karakterizaciji in identifikaciji ektomikorize se načeloma upoštevajo naslednje morfološke in anatomske značilnosti ektomikorize (Zak, 1973; Agerer, 1986-1990):

A) Morfološke značilnosti:

a) Tip vejanja mikorize zajema: enostavno, nerazvejano mikorizno korenino; monopodialno vejanje v eni ravnini; monopodialno piramidalno vejanje; dihotomno vejanje; iregularno dihotomno vejanje; koraloidno vejanje, pri katerem so dihotomno razvejane korenine tako kratke, da dajejo videz korale; gomolju podobna mikoriza, pri kateri so korenine kratke in tesno skupaj, tako da jih prekriva skupni hifni micelij in so posamezne mikorizne korenine vidne le na prerezu gomolja.

b) Makroskopske izmere mikorize: Pomembne so skupna dolžina mikorizne korenine, dolžina in premer nerazvejanih koncev mikorize in premer mikorizne osi.

c) Oblika nerazvejanih koncev: Ti so lahko ravni, malo ali razločno ukrivljeni, zaviti in nagubani. Ukrivljeni konci so v eni ravnini, zaviti pa pomenijo ukrivljenost v treh ravninah. Obročasto debelejši in tanjši deli nagubane mikorize izvirajo iz periodične rasti le-te.

d) Makroskopske značilnosti površine plašča: Površina plašča je lahko vidna ali pa prekrita z izhajajočimi hifami, ki zakrivajo površinsko strukturo; celice skorje so vidne v primeru, ko je mikorizni plašč zelo tanek. Površina plašča je lahko bleščeča, če

je ne prekrivajo izhajajoče hife; lahko je srebrnkasta, če se med hife na površju ujamejo mehurčki zraka; gladka površina je navadno (skoraj) brez izhajajočih hif; gladka površina je lahko dodatno retikulatna, če so vidne laticifere (t.j. poseben tip hif pri mikorizi, ki so značilne za glive iz rodu *Lactarius*, mlečnic; laticifere so debelejše od ostalih hif, prehajajo skozi različne plasti plašča in vsebujejo izloček mlečnic - mleček); zrnata površina vključuje zrnca, papile ali gomoljčke; volnato površino sestavljajo debelejše, volnate izhajajoče hife; bombažasta površina je prekrita s tankimi hifami kot plodovi bombaža; bradata površina je prekrita s hifami v šopih; kratko kocinasta površina je prekrita s kratkimi štrlečimi cistidiji (odebeljenimi, značilno oblikovanimi konci hif, ki se pojavljajo na plašču ali rizomorfih), ki so krajši od četrtine premera mikorize; dolgo kocinasta (dlakasta) površina pa je prekrita z daljšimi cistidiji.

e) Barva mikorize se načeloma določa le pod binokularjem, opremljenim z direktno svetlobo dnevne kvalitete in na črnem ozadju. Najenostavneje je določati barvo na barvnih posnetkih mikorize (posnetih s predpisano fotografsko opremo in kvaliteto filma). Ker se lahko barva spreminja s staranjem mikorize, so opisi ločeni za rastne vršičke, ostale dele nerazvejanih koncev in za starejše dele mikorize.

f) Rizomorfi v najširšem pomenu besede (vključno s povezki hif, *sensu* Agerer, 1988) predstavljajo hife, ki so na različne načine medsebojno povezane in rastejo bolj ali manj vzporedno in bolj ali manj tesno skupaj na večje razdalje. Makroskopsko ocenjujemo pri mikorizi pogostost pojavljanja rizomorfov, kje na mikorizi se pojavljajo, kako so povezani s plaščem, tip vejanja, obliko in premer prereza.

g) Izhajajoče hife se lahko razlikujejo po obliki, gostoti, po izhajanju iz rastnih vršičkov, starejših delov mikorize ali z vseh delov mikorize; tvorijo lahko hifne zastave.

B) Kemijski in fluorescenčni testi

Kemijski testi se izvajajo načeloma na svežem materialu pri standardizirani (dnevni) kvaliteti svetlobe in povečavi. Za primerjavo se navadno hkrati opazuje tretiran košček tkiva, npr. plašča, in netretiranega, v vodi. V uporabi so vse kemikalije, ki se navadno uporabljajo v determinaciji višjih gliv. Nekatere od teh, npr. etanol, KOH, mlečna kislina, se navadno uporabljajo za

testiranje topljivosti pigmentov in kristalov, lahko pa tudi spremenijo barvo mikorize. Sulfo-vanilin omogoča boljše ločljivost laticifer od ostalih hif.

Autofluorescenca se določa pri celi mikorizi in pri mikroskopskih preparatih, lahko na fiksiiranem materialu. Za izmere jeder in siderofilnih granul se navadno le-te obarva po različnih postopkih.

C) Anatomske značilnosti plašča in izhajajočih elementov

Mikroskopski preparati hifnega plašča se označujejo kot plektenhimatski, kjer so posamezne hife še spoznavne, ali kot psevdoparenhimatski, kjer ležijo hife tesno skupaj in spominjajo na parenhim. V tem primeru so lahko oblikovane bolj ali manj pravokotni, epidermoidno ipd. Včasih so spoznavni posebni vzorci, npr. zvezdasti vzorec hif. V notranjih slojih plašča pri mlečnicah so opazne že omenjene laticifere, ki so lahko različno obarvane in razvejane. Pri nefiksiranih preparatih je možno opazovati oblikovanost sept med celicami hif: doliporna septa (t.j. svetleče polkrogle strukture na obeh straneh septa hife, ki vsebujejo citoplazmo), ki so sicer značilni za Basidiomycete, ali Woroninovim telesom podobne strukture (t.j. majhne, okrogle strukture, ki močno odbijajo svetlobo, so blizu hifnih sept in še vsebujejo citoplazmo), ki so sicer značilna za večino Ascomycet. Včasih pa je sredi septa opazen 'zamašek', značilen za hife brez citoplazme pri obeh skupinah višjih gliv.

Med izhajajočimi elementi, hifami, cistidiji in rizomorfi, omenimo zlasti slednje. Rizomorfi (*sensu* Agerer, 1988) so lahko različno diferencirani, lahko so skupki enako oblikovanih hif, ali pa so posamezne, v najbolj diferencirani obliki osrednje hife debelejšje in imajo reducirana septa, tako da je translokacija snovi v njih neovirana. Prisotnost in razporeditev odebeljenih hif ter načini njihovega vejanja so pomembni taksonomski znaki. Pri rizomorfi in izhajajočih hifah so pomembne značilnosti povezav med hifami, anastomoz, ki lahko nastopajo sredi hife, med sredino in rastnim vršičkom hife, ob zaponki, ob septi, lahko tvorijo mostiček z zaponko ali s septo itd.

D) Anatomske značilnosti na prečnem in vzdolžnem prerezu

Na prečnem in vzdolžnem rezu je lahko opazna slojevitost plašča, mere hif v posameznih slojih, mere celic kaliptre, taninskih celic, celic skorje in število le-teh v Hartigovi mreži, oblika

in debelina slednje, itd. Rastni vršiček korenine se lahko razlikuje od ostalih delov po naštetih karakteristikah, zato se tega karakterizira ločeno.

2.3.3 Poimenovanje ektomikorize

V stoletni zgodovini raziskav ektomikorize so posamezni raziskovalci skušali urejati zmedo v opisovanju pojavov z uvajanjem klasifikacije mikoriznih tipov. Melin je 1927 razvrstil ektomikorizo v 4 tipe glede na njihovo splošno morfologijo (cit. v Zak, 1971). Dominik je 1956 opisoval več kategorij in pri tem upošteval nekatere anatomske značilnosti, npr. obliko plašča (ibid.). V šestdesetih letih se je s klasifikacijo ukvarjala že vrsta raziskovalcev, ki so upoštevali osnovna načela identifikacije glivnega simbionta in opisovali mikorizne tipe glede na vrsto drevesnega partnerja (npr. Zak, 1971 in 1973). Vendar pregledni skupni ključ, niti enotna terminologija in nomenklatura, niso bili sprejeti vse do leta 1986, ko je začel izhajati Barvni atlas ektomikorize (Agerer, 1986 - 1990).

Opisana (karakterizirana) ektomikoriza (po načelih iz poglavja 2.3.2), ki je bila nedvomljivo identificirana (micelij je nedvoumno povezoval mikorizo in trosnjak višje glive), se poimenuje po glivnem partnerju ob navedenem gostitelju, npr. identificirana je bila mikoriza *Russula ochroleuca* (Pers.) Fr., kjer je bil glivni partner *Russula ochroleuca* (Pers.) Fr., višja rastlina - gostitelj pa *Picea abies* Karst.

Opisana mikoriza, kjer ni bila mogoča nedvoumna identifikacija glivnega partnerja, dobi umetno dvojno ime (v narekovajih). Ime rodu je sestavljenka iz rodovnega imena gostitelja s končnico 'rhiza', npr. '*Piceirhiza*' (mikoriza na smreki). Ime vrste določi opisovalec glede na najbolj opazno značilnost mikorize, npr. '*bicolor*' (kjer obstajajo hife dveh barv pri isti mikorizi). Edina izjema pri tem poimenovanju je mikoriza *Cenococcum graniforme* Fr. ali *C. geophilum* Fr., ki jo je s tema imenoma opisoval že Frank konec prejšnjega stoletja in nastopa pod istim imenom (Agerer, 1990, priporoča drugega) pri različnih vrstah iglavcev. Predvidevajo, da jo tvorijo različne vrste gliv iz skupine Fungi Imperfecti (Harley & Harley, 1987). Pri hrastu, pri katerem pred 'Agererjevim' ključem še ni bila opisana, pa so (verjetno) to isto mikorizo poimenovali '*Quercirhiza atrata*'.

3. MATERIAL IN METODE DELA

Osnovne laboratorijske metode dela zajemajo tehnike gojenja mikoriznih gliv v *in vitro* pogojih, izolacije mikoriznih gliv iz trosnjakov in iz mikorizne korenine, produkcijo glivnega inokuluma in inokulacije semenk smreke, metode določanja stopnje mikoriznosti, identifikacije in karakterizacije ektomikorize ter osnovnih histoloških tehnik za študij mikroskopskih značilnosti mikorize. V prvi fazi raziskav sta bila zastavljena dva terenska poskusa, kjer je osnovni poudarek na metodi vzorčenja.

3.1 Izolacija in gojenje ektomikoriznih gliv

Tehnike gojenja mikoriznih gliv smo vezali predvsem na manjšo (referenčno) zbirko ektomikoriznih gliv, ki smo jo dobili iz zbirke Prof.dr.D.J.Reada z Univerze v Sheffieldu, U.K., leta 1988. V letu 1990 smo začeli zbirko dopolnjevati z glivami, izoliranimi iz trosnjakov, nabranih na nekaj inštitutskih poskusnih ploskvah v okolici Šoštanja.

Kolekcijo ektomikoriznih gliv gojimo v sterilnih pogojih na Melin-Norkransovem mediju (MMN), modificiranem po Marxu (Marx, 1969), polovična jakost, na trdnem in v tekočem mediju pri 22° in pri 19° ± 2° C, v temi. Glive presajamo v 1 do 2-mesečnih intervalih zaradi vzdrževanja virulentnosti.

Osnovna kolekcija gliv je gojena na trdnem mediju naslednje sestave:

(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.125	g/l
KH ₂ PO ₄	0.250	g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.075	g/l
CaCl ₂	0.025	g/l
NaCl	0.0125	g/l
FeEDTA	0.010	g/l
Thiamin-HCl	0.0001	g/l
Malt-ekstrakt (ječmenov slad)	1.5	g/l
D-glukoza	5.0	g/l
Agar	15	g/l
PH	5.8	

Glivne izolate, s katerimi smo dopolnili osnovno zbirko v letu 1990, smo pridobili po naslednjem postopku: večje število gliv iste vrste smo nabrali v radiju 30 m okoli izhodiščne točke na posamezni inštitutski poskusni ploskvi. Del gliv posamezne

vrste smo uporabili za determinacijo (determinator A.Piltaver, dipl.inž., po veljavnih ključih za določanje makromicet, predvsem po Moser, 1983, in odgovarjajočem slikovnem gradivu), del smo jih posušili pri 30° C, opremili s podatki in shranili v herbariju mikoriznih gliv na IGLG kot referenčne primerke, del pa smo uporabili za izolacijo micelija.

Sveže, mlade in čimbolj čiste primerke smo potopili za 5 minut v komercialno 20% raztopino NaOCl ('Varekina'), sterilno razrezali in koščke položili na trden medij (1/2 MMN kot zgoraj ali pa 2% Malt-ekstrakt, pH 5.8). Glive, ki niso bile okužene in so zrasle vsaj za 5 mm okoli izvirnega koščka micelija, smo dvakrat precepili in po ponovni preverbi okuženosti uvrstili v kolekcijo.

3.2 Umetna inokulacija semenk smreke

Semenke smreke so izvirale iz dveh virov semena: smreka št. 2/1985, BIH, Busovača, hranjena na IGLG od leta 1985 in smreka št. 62/1988, Hrvaška, Delnice, hranjena na IGLG od leta 1989. Sterilne semenke smo pridobili na dva načina: i) semena smo površinsko sterilizirali s stresanjem v 30% H₂O₂, 20 minut, ter jih kalili na vodnem agarju, na omočenem perlitu ali na šoti (vse sterilno), pri 22° C, 16 ur dnevne kvalitete svetlobe v klimakomori; ii) semena smo kalili nesterilno na filter papirju in na perlitu ob dnevni svetlobi na pultu, semenke pa sterilizirali s stresanjem v 5% NaOCl, 2-krat po 10 minut, ter sprali 3-krat s sterilno vodo. Za poskuse v pladnjih semenk nismo sterilizirali.

Inokulacijo smo preizkušali na več načinov: v sterilnih, polsterilnih in nesterilnih pogojih v rastlinjaku.

I. Metode inokulacije semenk smreke v sterilnih pogojih:

a) micelij posameznih vrst gliv smo vzgojili v erlenmajer posodah (250ml) v 100 ml substrata naslednje sestave: vermikulit : šota : perlit (8 : 2 : 1); substrat smo omočili s 30 do 75 ml (večinoma s 50 ml) tekočega polovičnega MMN medija z ali brez ječmenovega slada in glukoze; semena smreke smo sterilizirali in jih gojili hkrati z glivnim micelijem;

b) micelij smo gojili kot zgoraj (I.a) dva meseca in nato sterilno vsadili sterilizirane semenke smreke v iste erlenmajer stekleničke.

II. Metoda inokulacije semenk smreke v pol-sterilnih pogojih:

a) plastične petrijeve posodice smo napolnili s sterilizirano šoto, omočeno z destilirano vodo, ter izžgali v spodnji del posode luknjico; v to smo položili sterilno semenko smreke, tako da so bile korenine v posodi, stebelce z iglicami je bilo zunaj posode; na korenine smo položili tri koščke agarja (3 mm premera) z micelijem; posodico smo zaprli in ovili s plastičnim trakom ('Parafilm'), tako da se je tesno prilegal stebelcu smreke in zapiral luknjico v petrijevi posodi. Posodo smo dodatno ovili z alufolijo, da so bile korenine v temi.

III. Metoda inokulacije semenk smreke v nesterilnih pogojih:

a) micelij smo gojili kot zgoraj (I.a) 2 meseca, nato smo ga uporabili za inokulacijo večjih pladnjev v rastlinjaku (razmerja sestavin substrata v pladnjih so bila 6 : 4 : 1, substrat smo prekrili s plastjo peska, ter ga omočili z 1/2 MMN brez glukoze in ječmenovega slada); za inokulacijo smo uporabili po 2 do 3 erlenmajer posode; nato smo na vsak pladenj prepikirali po 100 nesterilnih kalic smreke (izvora Delnice, 1988, 85% kalivost). Pri tem poskusu smo pladnje zalivali ročno po potrebi. Testirali smo 6 vrst mikoriznih gliv (vsako na dveh pladnjih), dva pladnja sta bila kontrolna, brez glivnega inokuluma, dva pladnja z glivo *Laccaria bicolor* in dve kontroli pa smo dodatno uporabili za analize rasti pod vplivom kisle raztopine za zalivanje: enkrat tedensko smo zalivali s kislom raztopino mešanice 0.1 mM solne in 0.1 mM žveplene kisline. Poskus poteka od marca 1989 dalje z mesečnimi vzorčenji od maja 1989 do maja 1990 ter enkratnim vzorčenjem novembra 1990.

3.3 Metode terenskega dela

Na terenu smo vzorčili v dveh poskusnih različicah. Prvo smo navezali na nalogo 'Ekofiziološke raziskave pomembnejših drevesnih vrst' (šifra 170). Analizirali smo delež mikorize pri sadikah smreke (2+2+1 oziroma 2+2+2) s po petih poskusnih ploskev v Zavodnjah in v Mislinjskem jarku (zasajene kot sadike 2+2 leta 1988). Z vsake ploskve smo vzorčili po 3 sadike dvakrat letno (spomladi in jeseni). Dodatno smo hkrati vzorčili tudi po tri sadike z inštitutskega vrta.

Drugo poskusno različico smo navezali na obstoječe inštitutske poskusne ploskve v okolici Termoelektrarne Šoštanj. Ploskve so izbrane kot pari ploskev podobnih rastiščnih razmer, v bližini katerih stojijo ANAS postaje za dnevno merjenje onesnaženosti zraka, od katerih je po ena ploskev v paru na močno onesnaženem področju, druga pa na manj onesnaženem področju. Ploskve ležijo

na Zavodnjah (ta nima parne primerjalne ploskve, označena je kot ploskev 1); v Topolščici (manj onesnaženo področje, ploskev s šifro 2); njen bolj onesnažen par je ploskev na Lajšah (št. 3); na Velikem vrhu (močno onesnažena ploskev s šifro 4), njen par je ploskev na Pirešici (s šifro 5). Podrobnejše analize ploskev so opisane v poročilih naloge 'Vpliv Termoelektrarne Šoštanj na tla in vegetacijo' (šifra 185).

V tej poskusni različici smo izvedli dva poskusa: analizirali smo mikorizni potencial rastišč (prirejeno po metodi Kropaček *et al*, 1989) in analizirali delež in tipe mikorize pri naravnem mladju smreke in v organskih horizontih tal (Oh - Ah horizonti, od 0 do 20 cm globoko, po pet vzorcev s ploskve, jeseni 1990).

Za analize mikoriznega potenciala rastišč smo v juniju 1990 nabrali 2 do 3 litre talnih vzorcev (organskih horizontov tal) z vsake ploskve, jih presejali skozi 2 mm mrežo in jih del shranili za pedološke analize. Ostanek smo razdelili na dva dela, enega smo sterilizirali z avtoklaviranjem, ter nato oba dela uporabili za lončno zasnovan poskus analiz mikoriznega potenciala: na sterilizirano in nesterilno zemljo v loncih smo posejali seme smreke (št. 62/1988, Hrvaška, Delnice); od junija do oktobra so rastle v plastenjaku IGLG, od oktobra do vzorčenja v začetku decembra 1990 pa v drevesnici IGLG. Sterilizirana serija je služila za kontrolo morebitne naselitve ektomikoriznih gliv iz spor v zraku v plastenjaku oziroma na vrtu IGLG.

Obe opisani poskusni različici sta opisani in uvrščeni v osnovno nalogo raziskav mikorize predvsem zaradi preizkušanja in vpeljave novih poskusnih metod dela pri raziskavah mikorize. Na omenjenih petih ploskvah iz druge variante smo v jeseni 1990 vzorčili in popisovali pojavljanje makromicet, katere smo uporabili za izolacijo micelija (opisano pod točko 3.2).

3.4 Analize mikorize

Metode ocenjevanja deleža mikorize smo priredili po metodah, ki jih opisujejo Grand & Harvey (v Schenk, 1984), Schafer *et al*, 1985 in Stroo *et al*, 1988.

Za analize sadik in naravnega mladja s poskusnih ploskev na terenu smo analizirali po 3 primerke z vsake ploskve, pri vsakem smo izločili 3 lateralne korenine (dolge 5 do 10 cm) in

na teh določali delež mikoriznih (%) od vseh kratkih korenin (dolgih 2 do 15 mm) v vzorcu ter število kratkih korenin na cm lateralne (Primerjaj prilogo 1).

Umetno inokulirane semenke smreke, ki so rastle v nesterilnih pogojih v rastlinjaku, smo mesečno vzorčili (po 3 semenke na poskusno varianto) in določali poleg splošnih parametrov (debelina na koreninskem vratu, sveže teže in dolžine poganjkov in korenin) še število dolgih korenin (daljših od 15 mm), kratkih korenin (2 do 15 mm), število mikoriznih kratkih korenin (mikoriznost smo določali makroskopsko, z binokularjem, v dvomljivih primerih z dodatnim barvanjem po metodi Daughtridge *et al*, 1985) ter delež (%) mikoriznih korenin od vseh kratkih korenin v vzorcu. Enako smo določali delež mikorize pri analizah semenk iz poskusne variante testiranja mikoriznega potenciala rastišč (Primerjaj prilogi 2 in 3).

Za potrebe histoloških analiz smo korenine shranjevali v fiksični mešanici 40% formalina : 70% etanola : ledocetne kisline (5 : 90 : 5). Hkrati smo začeli z uvajanjem histoloških tehnik za optično mikroskopijo ter s poskusno analizo mikoriznih korenin z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Za te analize smo korenine dehidrirali, posušili pri kritični točki in analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JEOL JSM-840A (prof.dr.K.Drašlar, VTO za biologijo).

Fiksirane korenine smo dehidrirali, v nekaterih primerih predhodno tudi barvali po metodi Phillips & Hayman (1970), vključili v Paraplast ali v Historesin, pripravili 6 do 50 um tanke rezine in pripravili trajne mikroskopske preparate prečnih in vzdolžnih rezov. Prečne in vzdolžne reze svežih korenin smo pripravili s kriotomom (Reichert-Jung), preparate koščkov plašča, korenin in rizomorfov pa ročno s skalpelom pod binokularjem.

Mikroskopske preparate smo opazovali z mikroskopom Olympus BH2, v svetlem polju, s faznim kontrastom, Nomarskim interferenčnim kontrastom, avtofluorescenco pa v UV svetlobi. Mikorizo (*toto* preparate) smo opazovali z binokularjem Olympus SZH. Za fotografske posnetke preparatov smo uporabljali odgovarjajoči Olympusov AD sistem za kontrolo ekspozicije in fotoaparati C-35AD-4.

Identifikacija in karakterizacija mikorize je potekala po načelih, opisanih v poglavju 2.3.2, po ključu iz Barvnega atlasa mikorize (Agerer, 1986 - 1990).

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 Zbirka ektomikoriznih gliv

Gojenje kolekcije ektomikoriznih gliv po opisani metodologiji smo uvedli v rutinsko delo laboratorija za gozdno biologijo. Prvotno zbirko 13-tih gliv smo obogatili z domačimi izolati. Tako uvrščamo v kolekcijo v decembru 1990 izolate naslednjih vrst gliv (Tabela 1):

Tabela 1: Vrste in izvor ektomikoriznih gliv v zbirki IGLG

Vrsta	Izvor
<i>Amanita muscaria</i>	DJR, Canada
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	DJR, Oregon, USA
<i>Hebeloma subsaponaceum</i>	DJR
<i>Laccaria bicolor</i>	DJR, Canada
<i>Laccaria laccata</i>	DJR, Surrey, Ringwood, UK
<i>Laccaria proxima</i>	DJR, For.Comm., Bush, UK
<i>Lactarius rufus</i>	DJR, Clocaenog, UK
<i>Paxillus involutus</i>	DJR, Chapelton, UK
<i>Pezizela ericae</i>	DJR
<i>Pisolithus tinctorius</i>	DJR
<i>Suillus luteus</i>	DJR, Austria
<i>Suillus variegatus</i>	B.Grierson, N.Wales, UK
<i>Thelephora terrestris</i>	DJR, For.Comm., Bush, UK
<i>Boletinus cavipes</i>	TEŠ 1
<i>Collybia driophyllus</i>	IGLG
<i>Hebeloma sinapizans</i>	IGLG
<i>Laccaria amethystina</i>	TEŠ 3
<i>Laccaria amethystina</i>	TEŠ 1
<i>Laccaria amethystina</i>	TEŠ 4
<i>Lactarius detterimus</i>	IGLG
<i>Lactarius quietii</i>	IGLG
<i>Lycoperdon perlatum</i>	TEŠ 5
<i>Lycoperdon verrucosum</i>	IGLG
<i>Paxillus involutus</i>	TEŠ 1
<i>Russula nauseosa</i>	IGLG
<i>Suillus granulatus</i>	IGLG
<i>Thelephora terrestris</i>	TEŠ 2
<i>Xerocomus badius</i>	IGLG

DJR pomeni, da smo izolat dobili od Prof.Dr.D.J.Reada z Univerze v Sheffieldu, UK; B.Grierson z Univerze v Liverpoolu je podaril en izolat; ostale smo nabrali na vrtu IGLG ali na poskusnih ploskvah št. 1 do 5 v okolici TE Šoštanj.

4.2 Umetna inokulacija semenk smreke

Načeloma se goji micelij ektomikoriznih gliv pri temperaturi okoli 20° C, v temi; pri vseh poskusih inokulacije naj bi bile korenine semenk in micelij v temi, poganjki pa osvetljeni v določenem dnevno - nočnem ritmu (16 ur dan). Temperatura naj bi se gibala v mejah od 15 do 25° C. Testirali smo medije, kot jih priporočajo npr. Marx & Bryan (1971) idr.

Za poskuse inokulacije semenk smreke v sterilnih in polsterilnih pogojih ter za produkcijo večjih količin glivnega inokuluma smo v prvem letu uporabljali t.i. termoboks, grelno napravo, pokrito s plastiko ter laboratorijske pulte. Sredi drugega leta raziskav smo priredili kalilnik iz laboratorija za gozdno biologijo na zgoraj opisane rastne pogoje. Zaradi objektivnih razmer je bil le-ta v uporabi od oktobra do decembra 1990, ko smo večino sterilnih kultur prenesli v klimakomoro s hlajenjem, ki zaradi ventilatorja in nekontroliranih vlažnostnih razmer zelo osušuje substrate.

Pri poskusu umetne inokulacije semenk smreke v nesterilnih pogojih v rastlinjaku pa so bili pogoji za rast še slabši: temperature v vegetacijski dobi so nihale od 1 do 36° C, relativna vlaga je v poletnem času občasno padla pod 20%, svetlobne razmere so bile neprimerne zaradi poletnega senčenja strehe, namakanje je bilo ročno. Na (predhodno steriliziranih) rastnih podlagah se je pojavilo v rastlinjaku nekaj vrst asko- in hifomicet.

I. Inokulacija semenk smreke v sterilnih pogojih:

a) Micelij (iz poskusa I.a in b ter produkcija glivnega inokuluma za poskus III.a) je rasel najboljše na substratu, omočenem s 50 ml 1/2 MMN (na 100 ml podlage, v 250 ml erlenmajer stekleničkah). Po dveh mesecih je povsem prerastel podlago, omočeno z medijem z dodano glukozo in ječmenovim sladom. Slabša je bila razrast v podlagi brez teh dveh substanc, kjer se je razrastel predvsem micelij vrste *Suillus luteus*, vrsta *Amanita muscaria* pa sploh ni rastla.

b) Poskusno varianto, kjer smo hkrati z nasaditvijo micelija v stekleničke vsadili tudi sterilizirana semena smreke, smo po 2 mesecih rasti opustili zaradi okužb.

c) V poskusni varianti, kjer smo po dveh mesecih rasti micelija v stekleničke vsadili sterilizirane semenke smreke, je bila uspešna predvsem inokulacija semenk z glivo *Laccaria bicolor*. Rezultate prikazujemo v poglavju o identifikaciji in karakterizaciji ektomikorize (4.5) slikovno.

II. Inokulacija semenk smreke v polsterilnih pogojih:

Tehnika izvedbe poskusa, opisanega kot II.a, omejuje število ponovitev posameznih inokulacij (Slika 4). Zato smo v teh pogojih testirali le tri vrste gliv. Spet se je izkazala za najbolj virulentno vrsta *Laccaria bicolor*, uspešna je bila tudi vrsta *Pisolithus tinctorius*. To tehniko smo uvedli v laboratorij za gozdno biologijo jeseni 1990, zato nam še ni uspelo prebroditi pomembne ovire, pretiranega izsuševanja kultur.

III. Inokulacija semenk smreke v nesterilnih pogojih:

Neugodni pogoji za rast v poskusni komori v rastlinjaku, zlasti ekstremne temperaturne razmere in neprimerne svetlobne razmere so bistveno vplivale na predvsem na poskus, opisan kot III.a v metodah dela. Zaradi nesterilnih pogojev je prihajalo do naselitev substratov tudi z drugimi vrstami gliv, iz spor v zraku (Slika 5). Zabeležili smo dve vrsti gliv iz reda *Pezizales*: *Peziza ostracoderma*, katere tipično rastišče so prav sterilizirane podlage v rastlinjakih in nima letne časovne omejitve rasti, ima hrapave trose, ter druga vrsta iz rodu *Pezizela* s povsem okroglimi trosi (determinator A.Piltaver); zabeležena je bila tudi prisotnost ene vrste iz skupine *Hyphomycetes* in iz *Myxomycetes*, ki nista bili determinirani. Naštete glive niso opisane kot mikorizne pri smreki, zato smo sklepali, da ne bodo vplivale na poskus umetne inokulacije.

Negativni vplivi okolja na razvoj mikorize so vidni predvsem iz rasti semenk, predstavljene s težo cele semenke, korenin in nadzemnega poganjka v posameznih vzorčenjih (opravljenih je bilo 11 vzorčenj od 31.5.1989 do 27.11.1990), iz števila vseh kratkih korenin in mikoriznih korenin v posameznih vzorcih.

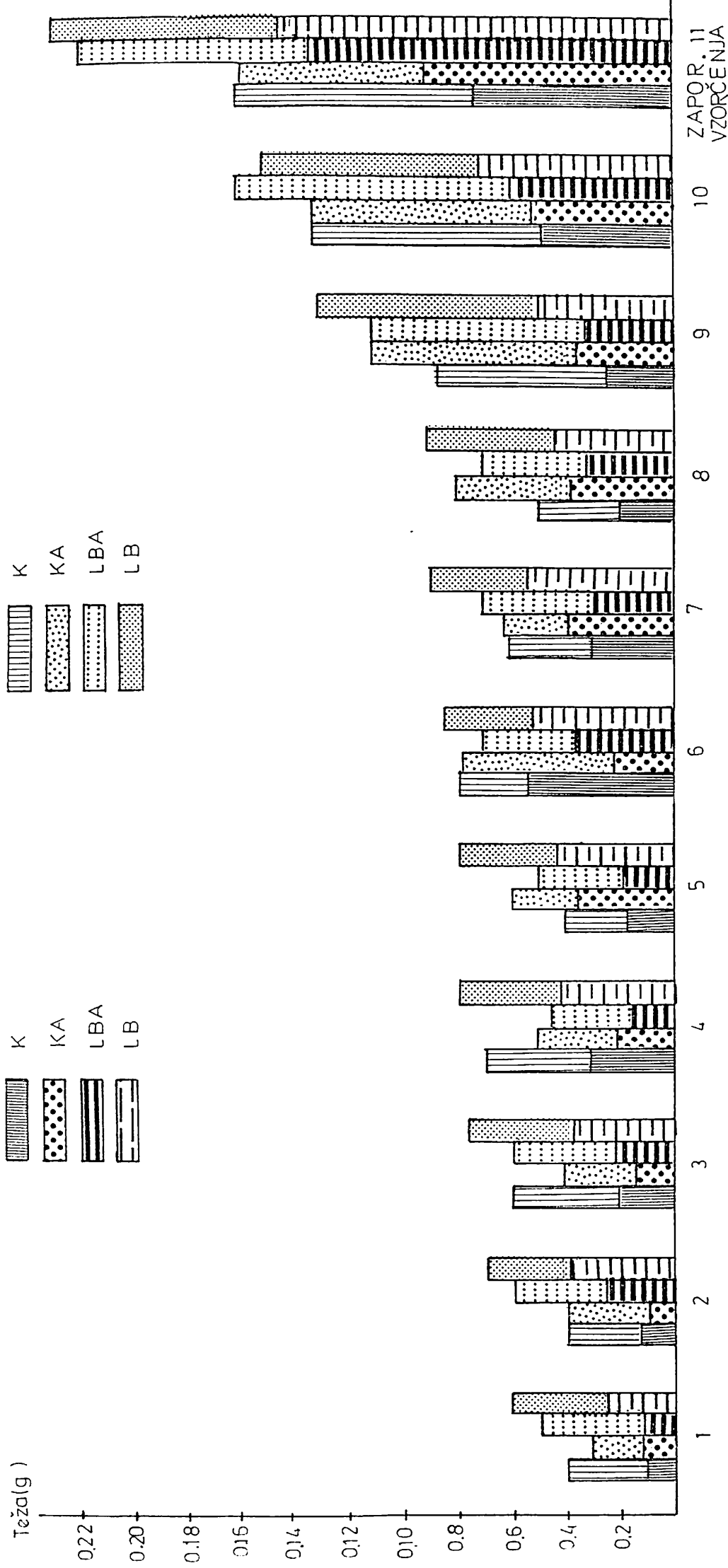
Večja rast semenk je bila zabeležena predvsem v jesenskem obdobju druge vegetacijske dobe (Slika 6). Podobno velja za število kratkih korenin (Slika 7). Od 5. vzorčenja dalje (4.10.1989) smo dve poskusni varianti (označeni kot KA in LBA) zalivali s kislom raztopino. Pri teh variantah je bila v nadaljevanju poskusa zabeležena manjša rast, manjša teža in število kratkih korenin, glede na kontrolni varianti (označeni s K in LB). Ob vseh vzorčenjih pa je bila zabeležena večja rast semenk, inokuliranih s katerokoli vrsto mikoriznih gliv, glede na kontrolo (LB in LBA glede na K in KA na slikah 6 in 7).



Slika 4: Primer inokulacije semenk smreke v polsterilnih pogojih v petrijevi posodi

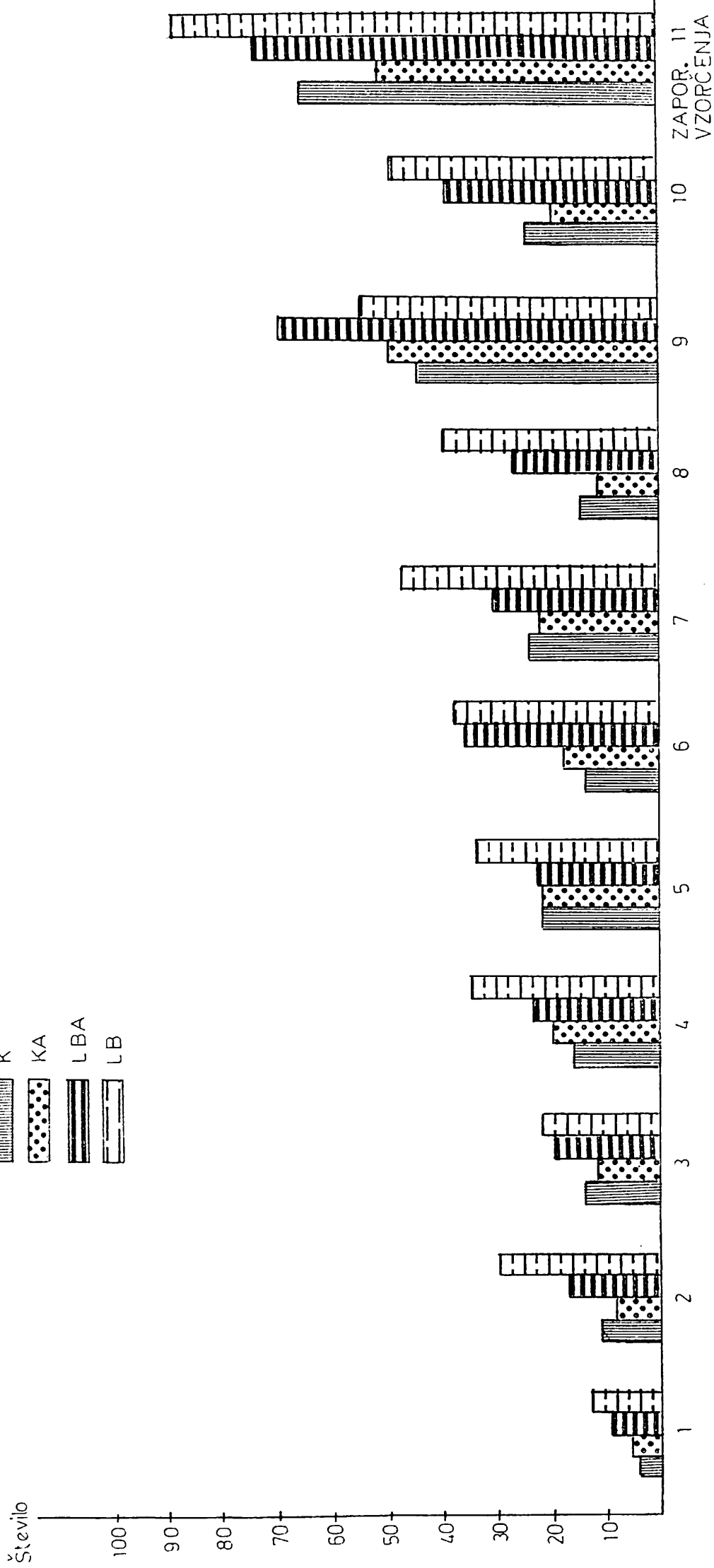
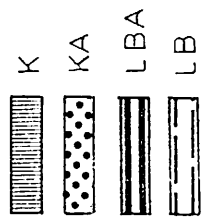


Slika 5: Naselitev gliv iz redu *Pezizales* na pladnje s predhodno sterilizirano podlago pri poskusu umetne inokulacije semenk smreke v nesterilnih pogojih v rastlinjaku



Slika 6: Skupna teža semenk smreke, teža nadzemnih poganjkov in teža korenin ob posameznih vzorčenjih. Od petega vzorčenja dalje smo pladnje z oznakami KA in LBA zalivali s kisljo raztopino. Vrednosti so poprečja po 3 semenka na poskusno varianto, LB je poprečje vseh inokulacij. Spodnji del histogramov je teža korenin, zgornji nadzemnih poganjkov, cel stolpec predstavlja skupno težo.

ŠTEVILO KRATKIH KORENIN



Slika 7: Število kratkih korenin semenk smreke v poskusu inokulacije semenk smreke v nesterilnih pogojih v pladnjih. Od petega vzorčenja dalje smo pladnje z oznakami KA in LBA zalivali s kisló raztopino. Vrednosti so povprečja po 3 semenk na varianto, LB je povprečje vseh variant inokulacije.

Sama inokulacija je bila neuspešna. Razvitost mikorize smo zabeležili le v nekaj primerih, z nekaj procenti (Tabela 2). Ob prvem vzorčenju je bila zabeležena razvita mikoriza z vrstami *Laccaria bicolor* (11.5%), *Suillus luteus* (19%) in *Pisolithus tinctorius* (6%); ob drugem vzorčenju z vrstami *Thelephora terrestris* (25%), *Amanita muscaria* (2%) in *Laccaria laccata* (4%). Sledili so izredno neugodni letni meseci, ko mikoriza ni bila nikjer zabeležena. Ob 6. vzorčenju, 11.12.1989, je bila mikoriza razvita le pri vrsti *Laccaria bicolor* (18.7 in 7.2 %), kjer se je obdržala z nekaj procentnim deležem še do zadnjega vzorčenja v letu 1990.

Tabela 2: Razvitost mikorize pri umetni inokulaciji semenk smreke v nesterilnih pogojih v rastlinjaku. Vzorčenja so bila izvedena v naslednjih dneh: 1./31.5.1989, 2./26.6.1989, 3./28.7.1989, 4./4.9.1989, 5./4.10.1989, 6./11.12.1989, 7./30.1.1990, 8./7.3.1990, 9./4.4.90, 10./17.5.1990, 11./27.11.1990. Vrednosti so poprečja analiz 3 semenk iz vsake poskusne variante.

Vrsta	Delež mikorize (%) / Vzorčenje										
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontr.s k.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.bicol.s k.</i>	12	-	-	-	-	19	-	-	3	-	-
<i>L.bicolor</i>	-	-	-	-	-	7	-	7	-	-	4
<i>T.terrestris</i>	-	25	-	-	-	-	-	-	4	-	-
<i>A.muscaria</i>	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.laccata</i>	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.luteus</i>	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.tinctorius</i>	6	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-

4.3 Primerjalna analiza mikoriznih sadik smreke s poskusnih ploskev v Zavodnjah, Mislinjskem jarku in v Ljubljani

Deleži mikoriznih korenin pri sadikah smreke s poskusnih ploskev v Zavodnjah, Mislinjskem jarku (obakrat po 5 ploskev z različno stopnjo zastrtosti) ter v drevesnici IGLG v Ljubljani (ena ploskev) so prikazani v Tabeli 3.

Tabela 3: Delež mikoriznih korenin (%M) pri sadikah smreke

Ploskev Kraj/Oznaka	%M ob posameznih vzorčenjih				poprečje
	5.1989	9.1989	5.1990	9.1990	
IGLG	27.7	45.3	31.3	6.3	27.6
Zavodnje/1	19.8	69.0	22.7	42.7	38.5
/2	26.3	74.3	16.4	53.6	42.6
/3	27.0	33.3	20.0	43.8	31.0
/4	27.0	50.0	31.7	48.7	39.3
/5	43.4	43.0	24.1	26.5	34.2
poprečje	28.7	53.9	23.0	43.1	37.1
Mislinja/1	8.3	10.7	5.9	19.0	11.0
/2	20.2	33.6	17.2	9.6	20.1
/3	67.3	41.0	24.8	23.3	39.1
/4	47.3	14.7	16.3	10.5	22.2
/5	26.8	0.0	19.0	15.2	15.2
poprečje	34.0	20.0	16.6	15.5	21.5

Vrednosti v tabeli so izračunane iz po treh vzorcev z vsake ploskve. Posamezni avtorji (Grand & Harvey, v: Schenk, 1984) izračunane procente mikoriznih korenin navadno uvrstijo v range, npr. 0-24% predstavlja slabo razvito mikorizo, 25-49% zmerno, 50-74% dobro in nad 75% odlično razvito mikorizo. Tako bi poprečne spomladanske ocene mikorize v prvem letu lahko uvrstili v zmerno razvitost mikorize, enako tudi spomladansko oceno mikorize na vrtu IGLG v letu 1990. Vsi ostali vzorci iz Mislinjskega jarka so imeli slabo razvito mikorizo, jesenski vzorci iz Zavodnjah pa so imeli dobro razvito mikorizo.

Od vzorčenj v letu 1989 do zadnjih vzorčenj je opazen trend k slabši razvitosti mikorize na vseh ploskvah.

Štiriletne sadike smreke so bile na poskusne ploskve posajene leta 1988. V prvem letu se je mikoriza razvila pri večini testiranih sadik, predvsem na sadikah, posajenih v zaradi onesnaženja in sanitarnih sečenj močno presvetljen sestoj na Zavodnjah, kjer je bila zabeležena dobro razvita mikoriza tudi v naslednjih vzorčenjih, medtem ko je bila mikoriza v Mislinjskem jarku slabše razvita. Vzrokov je lahko več: Schafer et al (1985) poroča, da zmerno zakisanje tal ovira razvoj mikorize (kar bi lahko aplicirali na Mislinjski jarek), ekstremno zakisanje (pH 2.5) pa razvitost mikorize poveča. Miller (1982) in več drugih avtorjev poroča, da je razvoj mikorize odvisen od stopnje razvoja matičnega sestoja oziroma od sukcesijskega stadija gostiteljev in gliv - v presvetljenem sestoju se pojavljajo v večjem številu klice smreke, ki pozneje propadejo in razvojni stadij se ponavlja. Slabša razvitost mikorize v Mislinjskem jarku pa lahko povežemo tudi z ugotovitvijo Goblove (1986), da se pri dobri preskrbljenosti s hranili (kot je primer v Mislinjskem jarku), ko je mikoriza normalno slabše razvita, in dodatnih začetnih vplivih kislih padavin, mikoriza zmanjšana tudi za 50%.

S ploskev v Zavodnjah in Mislinjskem jarku smo jeseni 1990 dodatno pilotsko identificirali (kar pomeni, da determinacije niso še povsem zanesljive) mikorizo z naravnega mladja smreke. Primerki iz Zavodnjah so imeli razvitih vsaj 25 različnih tipov mikorize. Masovno se je pojavljal *Xerocomus badius*, *Xerocomus chrysenteron*, *Suillus sp.*, *Laccaria amethystina*, *Paxillus involutus*, *Russula ochroleuca*, v manjšem številu pa *Boletus edulis*, *Amanita citrina*, *Piceirrhiza obscura*, *Piceirrhiza rufosimilis*, *Piceirrhiza bicolorata*, *Piceirrhiza nigra*, *Cenococcum graniforme*, *Lactarius subdulcis*, *Lactarius sp.*, *Dermocybe semisanguinea*, *Cortinarius obtusus*, *Cortinarius venetus*, *Cortinarius sp.*, in še 5 do 7 povsem neznanih tipov.

Primerki iz Mislinjskega jarka so imeli razvite naslednje tipe mikorize: masovno *Russula ochroleuca*, *Paxillus involutus*, *Xerocomus badius*, *X. chrysenteron*, *Amanita sp.* (pri zadnjih treh smo zabeležili tudi mikorizo v propadanju), manj je bilo tipov *Cortinarius sp.*, *Piceirrhiza nigra*, *Cenococcum graniforme*, *Lactarius sp.*, *Lactarius picinum*, *Hebeloma edurum*.

Za bolj onesnažena področja navajajo tuji avtorji predvsem pojavljanje tipov *Laccaria laccata*, *Inocybe lacera*, *Russula ochroleuca*, *Cenococcum geophilum* in *Paxillus involutus* (Kowalski et al, 1989). Skupna teža in število kratkih korenin sadik smreke se v imisijskih področjih praviloma zmanjša (Blaschke, 1987), predvsem zaradi t.i. meristematske aborcije, pri kateri apikalni meristem preneha z delitvami. Korenina ne raste naravnost, ker stranski del meristema prevzame funkcijo apikalnega meristema (Metzler, Oberwinkler, 1987).

4.4 Naravno mladje smreke in mikorizni potencial organskih horizontov tal petih ploskev v okolici TE Šoštanj

Pri naravnem mladju smreke s petih raziskovalnih ploskev v okolici TE Šoštanje smo identificirali naslednje tipe mikorize z naslednjim deležem pojavljanja od celotnega deleža mikoriznih kratkih korenin:

Ploskev 1 - Zavodnje

<i>Cenococcum geophilum</i>	10%
<i>Piceirhiza nigra</i>	10%
<i>Paxillus involutis</i>	70%
ostalo	10%

Ploskev 2 - Topolščica

<i>Piceirhiza nigra</i>	10%
<i>Dermocybe sanguinea</i>	10%
<i>Piceirhiza horti-inflata</i> ?	35%
<i>Lactarius</i> sp.	10%
<i>Cantharellus tubaeformis</i> ?	20%
<i>Laccaria amethystina</i>	5%
<i>Cortinarius venetus</i>	5%
<i>Cortinarius</i> sp.	5%

Ploskev 3 - Lajše

<i>Paxillus involutus</i>	60%
<i>Piceirhiza obscura</i>	20%
<i>Cortinarius</i> sp.	10%
<i>Piceirhiza bicolorata</i>	5%
<i>Cenococcum geophilum</i>	5%

Ploskev 4 - Veliki vrh

<i>Cortinarius obtusus</i>	30%
<i>Piceirhiza nigra</i>	10%
<i>Cenococcum geophilum</i>	10%
<i>Paxillus involutus</i>	15%
<i>Laccaria amethystina</i>	25%
<i>Lactarius</i> sp.	5%
ostalo	5%

Ploskev 5 - Pirešica

Cenococcum geophilum malo
Ostalo neidentificirano zaradi premajhnega števila primerkov smreke; večino mladja predstavljajo bukev, nekaj bora, hrast idr. listavci.

Pri analizah mikoriznega potenciala rastišč smo določali skupno težo, težo nadzemnega poganjka, težo korenin, število kratkih korenin na cm lateralne, delež mikoriznih korenin in tipe

mikorize, v kolikor je bila le-ta že dovolj razvita. Rezultati so poprečje meritev petih semenk. Pri kontrolnih vzorcih (avtoklavirani vzorci tal) nismo zabeležili nobene mikorizne korenine. Rezultati analiz vzorcev presejanih organskih horizontov tal so prikazani v tabeli 4, rezultate analiz semenk smreke v tabeli 5, tipi mikorize pa so uvrščeni na koncu.

Tabela 4: Splošni podatki o talnih vzorcih (Al.ekstrakti P in K so izraženi v mg/100g tal)

Ploskev	pHH ₂ O	pHKCl	pHCaCl ₂	Al.P ₂ O ₅	Al.K ₂ O	N%	S%	S/N
Zavodnje	4.32	3.82	3.93	sl	8	0.29	0.072	0.25
Topolšica	4.10	3.25	3.40	sl	16	0.43	0.076	0.18
Lajše	3.82	3.24	3.37	sl	13	0.47	0.079	0.17
Vel.vrh	4.30	3.65	3.76	sl	14	0.10	0.047	0.47
Pirešica	4.06	3.40	3.47	2	17	0.06	0.067	1.12

Tabela 5: Analizni rezultati semenk smreke (Tsk=teža skupno, Tzg=teža nadzemnega poganjka, Tk=teža korenin, KK = število kratkih korenin, %M=delež mikoriznih od vseh kratkih korenin v vzorcu; teža oziroma masa je izražena v g; rezultati so povprečje 5 meritev)

Ploskev	Tsk	Tzg	Tk	KK	%M
Zavodnje	0.054	0.033	0.021	21.4	30.7
Topolšica	0.055	0.034	0.021	25.4	76.0
Lajše	0.044	0.029	0.015	12.0	63.1
Vel.vrh	0.054	0.033	0.021	18.6	13.7
Pirešica	0.069	0.047	0.022	17.6	27.2

S primerjavo parov ploskev Topolšica - Lajše in Pirešica - Veliki vrh opazamo večjo rast semenk smreke na talnih vzorcih z manj onesnaženih ploskev (Topolšica in Pirešica), zlasti nadzemnih poganjkov. Masa korenin je bila najmanjša pri vzorcih, ki so rastle na talnih vzorcih s ploskve v Lajšah, kjer je bilo zabeleženo tudi najmanjše število kratkih korenin. Razmeroma nizko število kratkih korenin pri vzorcu iz Pirešice pa bi bilo potrebno pri analizah dopolniti z večjim številom daljših lateralnih korenin (dvakrat več kot v vseh ostalih vzorcih).

Iz analiz deleža mikorize opažamo odlično zastopanost mikorize in s tem mikorizni potencial rastišča zlasti pri vzorcu iz Topolšice, dobro pri vzorcu iz Lajš, zmerno pri vzorcih iz Zavodnj in iz Pirešice in slabo zastopanost mikorize in s tem mikorizni potencial rastišča pri vzorcu z Velikega vrha.

V navedenih lončnih poskusih smo identificirali naslednje tipe mikorize:

Ploskev 1 - Zavodnje (skupno 5 tipov mikorize)
Piceirhiza horti-atrata
Piceirhiza glutinosa
Paxillus involutus ?
Laccaria amethystina
in še ena neidentificirana vrsta

Ploskev 2 - Topolšica (skupno 5 tipov mikorize)
Laccaria amethystina
Thelephora terrestris
Piceirhiza obscura
Piceirhiza bicolorata
Amphinema bissoides

Ploskev 3 - Lajše (skupno 6 tipov mikorize)
Cenococcum geophilum
Amphinema bissoides
Piceirhiza guttata
Laccaria amethystina
Cortinarius hercynius
Cortinarius sp.

Ploskev 4 - Veliki vrh (skupno 3 tipi mikorize)
Cenococcum geophilum
Laccaria amethystina
Cortinarius sp.

Ploskev 5 - Pirešica (skupno ca 7 tipov mikorize)
Cenococcum geophilum
Piceirhiza nigra
Piceirhiza bicolorata
in več neidentificiranih tipov mikorize.

Pri zadnjih analizah je potrebno poudariti, da smo poskus izvajali v plastenjaku oziroma v drevesnici IGLG, kjer ni bilo mogoče vplivati na temperaturne razmere, od junija do decembra 1990. Predvidevamo, da je prišlo zlasti v zadnjih dveh mesecih (od oktobra do decembra) do zastoja v rasti smreke in mikoriznega inokuluma, zato bi bilo potrebno poskus nadaljevati še vsaj do poznih pomladnih mesecev. Pri identifikacijah je

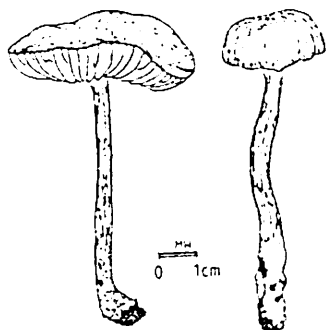
predstavljal poseben problem predvsem mlad razvojni stadij vseh navedenih tipov mikorize. Hkrati je naselitev posameznih tipov mikorize pogojena s starostjo stestnega materiala (semenk smreke), saj je znano, da se posamezne mikorizne glive naseljujejo izključno na korenine starejših gostiteljev (Last et al, 1987).

4.5 Identifikacija in karakterizacija posameznih tipov mikorize

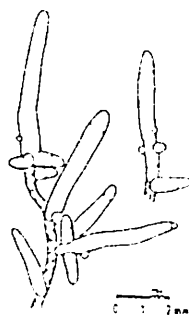
Identifikacija in karakterizacija posameznih tipov mikorize je potekala po navodilih in ključu - Barvnem atlasu mikorize (Agerer, 1987-1990) ter člankih in doktorskih disertacijah skupine pod vodstvom Dr.R.Agererja (predvsem po :Gronbach, 1988; Uhl, 1988; Weiss, 1988; Treu, 1990; Weiss & Agerer, 1988). Ker ni namen prve faze te raziskave predstaviti kompletnega ključa za določanje ektomikorize, predstavljamo nekaj izbranih in bolj pogostih tipov mikorize slikovno. Podrobneje predstavljamo le mikorizo smreke z glivo *Laccaria bicolor*, iz lastnih poskusov inokulacije in z dopolnili s slikovnim materialom in disertacije M. Weiss-a (1988).

Laccaria bicolor

Sliki 8 in 9 predstavljata trosnjak oziroma tip vejanja mikorize smreke z glivo *Laccaria bicolor*.



Slika 8: *Laccaria bicolor*.
Trosnjak.

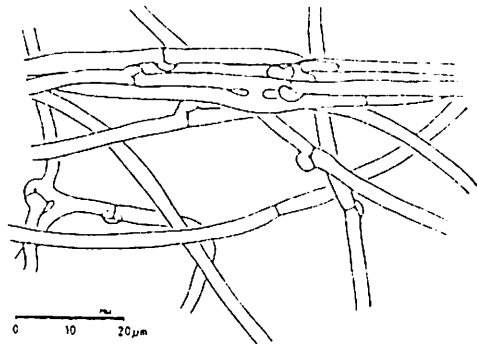


Slika 9: *Laccaria bicolor*.
Skica mikorize.

Mikorizni sistem se razrašča monopodialno piramidalno, običajno ni daljši od 6 mm. Stranski izrastki so dolgi do 1.5 mm in debeli do 0.7 mm. Zgornja površina mikorize je gladka. Mladi vršički mikorize so vijolično obarvani, sledi zlatorjava barva,

najstarejši deli mikorize so rjavi. Mikorizo obdajajo izhajajoče hife, podobno pajčolanu, ki so sprva vijoličasto bele, kasneje bele do zlato rjave.

Izhajajoče hife (Slika 10) so gladke, 2-3(4) um premera, s sponkami in enostavnimi septami; anastomoze so enostavne.



Slika 10: *Laccaria bicolor*. Izhajajoče hife.

Plašč (Slika 11) je na površini pokrit s pajčolanom izhajajočih hif; pod njim je vzorec hif plektenhimatski; hife merijo 3-5(8) um, pogosto so razcepljene; občasno so opazni mehurčasti elementi do 16 um premera; septe so enostavne, v zunanjih slojih občasno opazne sponke.

Spodnji sloji plašča so plektenhimatski do psevdoparenhimatski, septe so enostavne, pogosti so nepravilno, včasih mehurčasto oblikovani elementi, ki merijo 3-20 um premera.

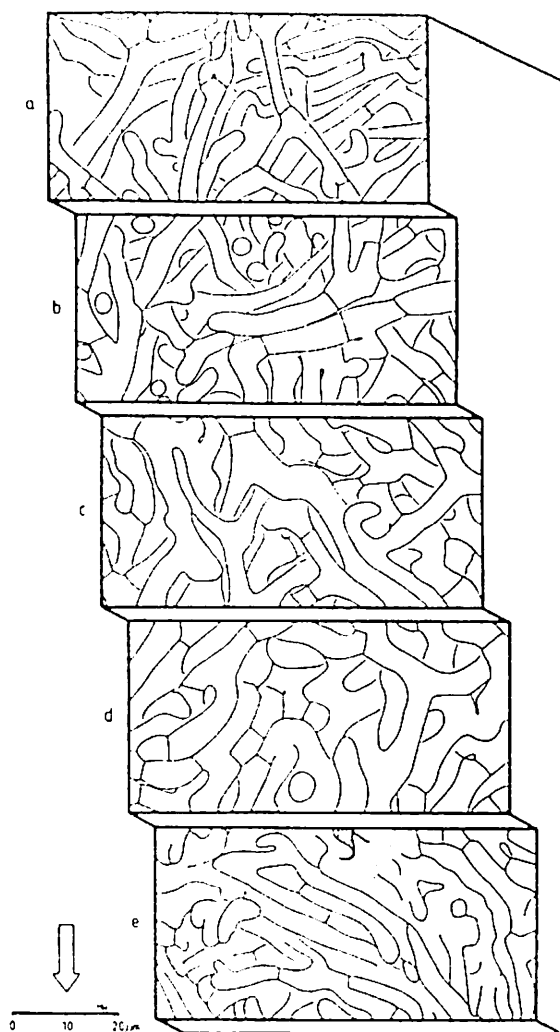
Notranje sloje plašča sestavljajo bolj ali manj vzporedne hife 2-6 um premera, opazne palmetaste strukture, z enostavnimi septami.

V vzdolžnem rezu je plašč 25-40 um debel, proti notranjosti sestavljen iz plektenhimatskih hif 2-7(10) um premera.

Hartigova mreža sega lahko do endoderma; v predelu taninskih celic je 1-3 slojna, celice so 2-7 um debele; okoli celic skorje leži en sloj 2-5 um debelih celic; deli palmet so 1-6 um široki.

Sinteza mikorize s smreko je uspela v umetnih pogojih na IGLG v erlenmajer bučki, v petrijevi posodi in delno v pladnjih v rastlinjaku. V naravi je ta mikoriza zelo podobna mikorizi smreke z glivo *Laccaria amethystina*. V starejših stadijih sta obe mikorizi neločljivi po anatomskih značilnostih (Weiss, 1988). Fotografski posnetek slednje prikazuje slika 12.

Za ponazoritev dela pri karakterizaciji in identifikaciji ek-
tomikorize prikazujemo v nadaljevanju različen slikovni
material (Slike 13 do 20).



Slika 11: *Laccaria bicolor*. Površina plašča v 5 ravninah.
a: zgornja površina plašča; b: zunanji sloj plašča;
c,d: globlje ležeče plasti plašča; e: notranja povr-
šina plašča (puščica kaže smer rasti korenine).



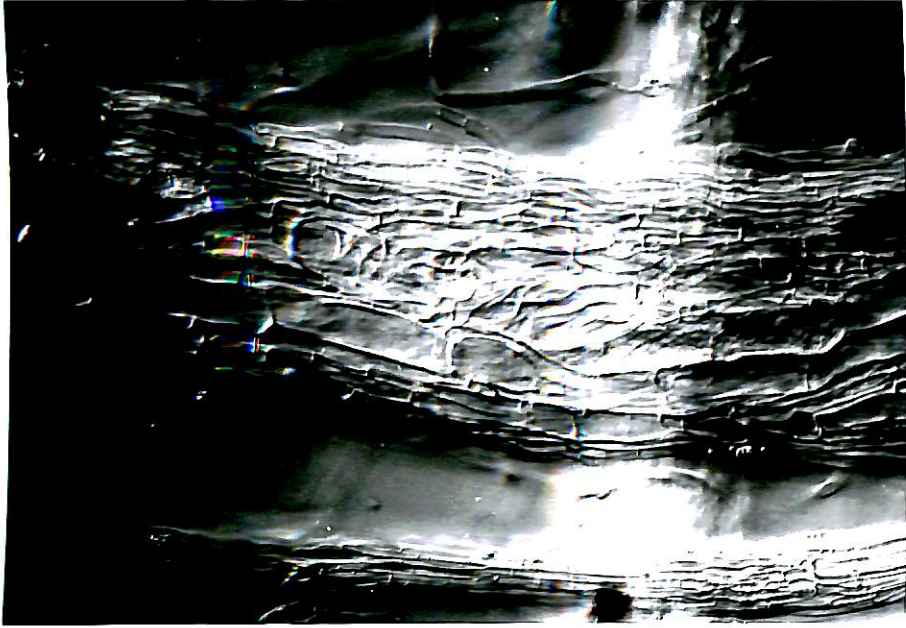
Slika 12: *Laccaria amethystina*. Mikorizna korenina smreke s poskusne ploskve na Velikem vrhu blizu Šoštanja. Povečava 10X.



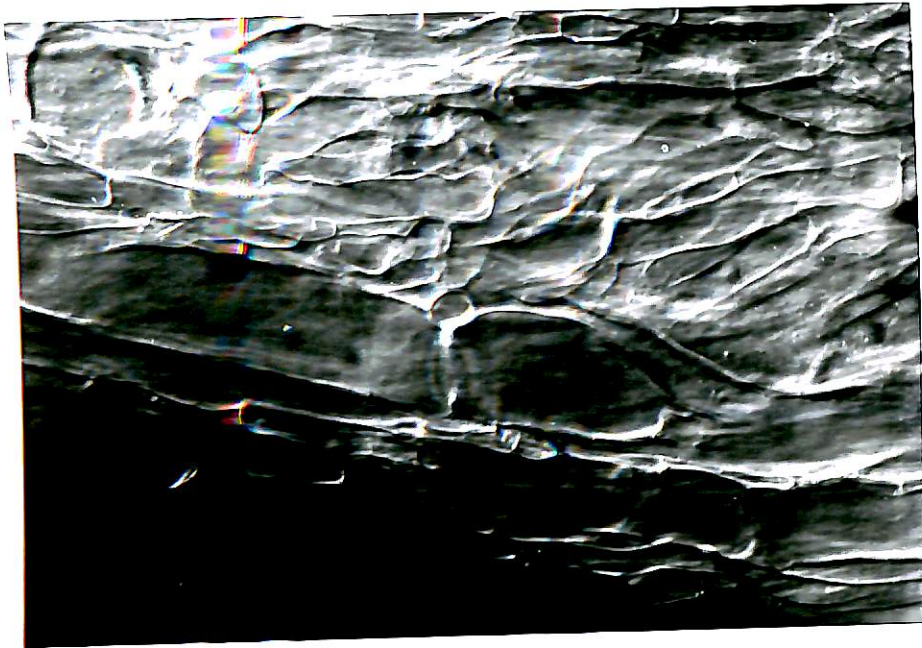
Slika 13: *Xerocomus badius*. Opazni so rjavkasti madeži, ki se po dodatku KOH obarvajo rdeče. Razrast je monopodialno - piramidalna. Značilno je izraščanje rizomorfov. Povečava 10X.



Slika 14: *Piceirhiza nigra*. Mikoriza temno rjave do črne barve, monopodialno - pinatna razrast, nerazvejani konci zviti. Povečava 10X.



Slika 15: *Xerocomus badius*. Rizomorf z odebeljeno centralno hifno. (Povečava 100X, NIC)



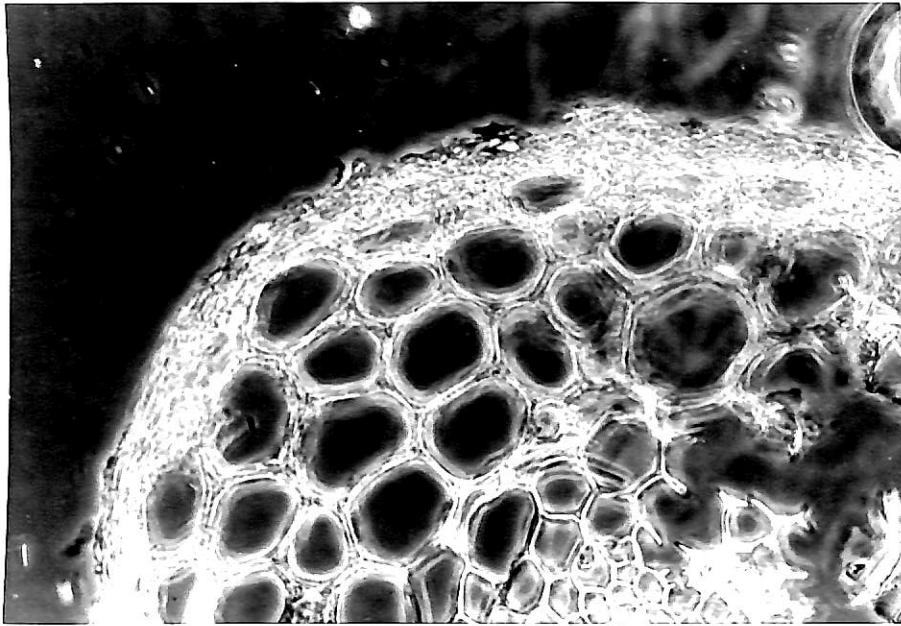
Slika 16: *Xerocomus badius*. Centralna hifa rizomorfa s popolno razvito septo. (Povečava 250X, NIC)



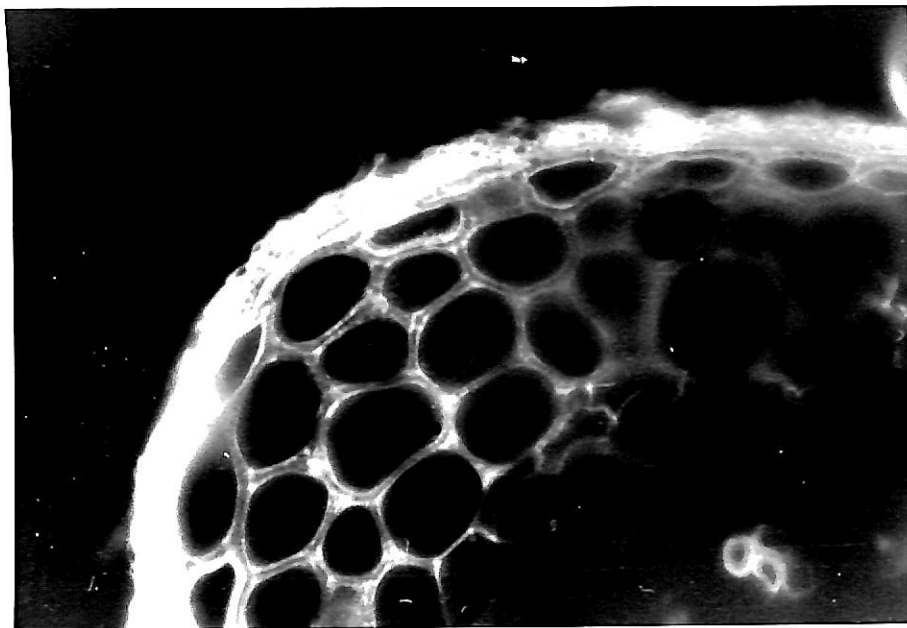
Slika 17: *Thelephora terrestris*. Zunanja površina plašča s cistidiji. (Povečava 250X, NIC)



Slika 18: *Lactarius* sp. Notranji sloji plašča z laticiferami, v katerih so vidne kapljice mlečka. (Povečava 250X, NIC)



Slika 19: Prečni prerez neidentificirane mikorize. (Ph.C)



Slika 20: Autofluorescenca istega prečnega prereza v UV svetlobi (s slike 19). (Povečava 100X)

S sodobnimi pristopi k identifikaciji ektomikorize smo začeli šele v zadnjem polletju drugega leta prve faze raziskav, potem, ko smo se udeležili prvega praktičnega seminarja o tovrstnih raziskavah, ki ga je organiziral Prof.Dr.R.Agerer v Munchnu za 16 udeležencev z vsega sveta. V predhodnih analizah smo prisotnost mikorize potrjevali predvsem z barvanji (Phillips, Hayman, 1970, Daughtridge et al, 1986). Le-ta, predvsem predhodno razbarvanje korenin, lahko povzročajo artefakte pri ocenjevanju stanja mikorize. Neoporečne rezultate dajejo neinvazivne metode dela z neobarvanimi, čimbolj svežimi preparati. Pri tem delu je potrebno opozoriti na več problemov:

1. Večino znakov je potrebno proučevati na svežem materialu, torej v prvih dveh dneh po vzorčenju. Za karakterizacijo umetno inokuliranega materiala je možno vzorčenje po potrebi, ob vsakem vzorčenju na terenu pa je navadno količina materiala prevelika za hitro analizo vsega materiala hkrati. Po nekaj dneh pa lahko pride najprej do sprememb barve mikorize, kasneje do drugih morfoloških sprememb, predvsem pa so na starem ali fiksiranem materialu nemogoči vsi kemijski testi. Hkrati lahko ob daljšem shranjevanju pride do naravnega staranja mikorize. Prav za mikorizo s posameznimi vrstami iz rodu *Laccaria* je znano, da je njena življenjska doba kratka, vitalna je lahko tudi le en teden, potem začne propadati.

2. Kljub sodobnemu ključu (Barvni atlas mikorize, Agerer, 1986-1990), ki je na voljo, je za vsakršno določanje identitete potrebno veliko praktičnih izkušenj. Mi smo s tem delom začeli šele jeseni 1990, zato večina naših določitev še ni povsem zanesljiva (kar bo verjetno šele čez nekaj let). Najboljši pristop k spoznavanju posameznega tipa mikorize je še vedno umetna inokulacija in natančna, postopna karakterizacija, ki naj bi jo opravil vsak mikorizni taksonom. Vendar nastopa tu dodatni problem - mikoriza, zrasla v mešanici z vermikulitom, se navadno morfološko razlikuje od enake mikorize, zrasle v naravnih pogojih. Zato je nujno hkratno zasledovanje mikorize na terenu, torej odvzem posameznih sporokarpov in okolnega talnega materiala s koreninami, ter iskanje neposrednih povezav med micelijem, ki izrašča iz tega sporokarpa in koreninami (smreke).

3. V ključu (ibid.) je doslej obravnavanih skupno 79 tipov mikorize, od teh 38 s smreko kot gostiteljem. Nekatere od teh mikoriz so podrobno opisane in opremljene s slikovnim gradivom v posameznih člankih in disertacijah sodelavcev iz skupine Dr. Agererja. Problema sta vsaj dva: 1. tipi, ki nastopajo s smreko, vendar so opisani pri nekaterih drugih drevesnih vrstah, se lahko v določenih značilnostih pri smreki razlikujejo; 2. tudi če bi upoštevali vseh 79 tipov mikorize, nastopa lahko pri smreki še vsaj toliko dodatnih tipov mikorize,

ki še niso dostopni v literaturi. Na naših ploskvah smo tako našli vsaj na en tip, ki smo ga povezali z glivo *Cantharellus tubaeformis*, za katerega v literaturi še ni opisov. Vsaka karakterizacija pa v takem primeru zahteva večkratno opazovanje, in vsako od teh vsaj kakšen teden dela.

Iz omenjene problematike je razvidna velika zamudnost dela pri identifikaciji in karakterizaciji ektomikorize. Naj omenim še samo čiščenje vzorcev mikorize, pripravo mikroskopskih preparatov, pripravo mikroskopa (na fazni kontrast, UV, Nomarsko interferenčno mikroskopijo, na fotografijo, za risanje preparatov), barvanja tkiv ali celičnih struktur itd. Ob vsaki natančni karakterizaciji bi bilo zaželeno opazovanje mikorize tudi z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Zato vse identifikacije iz prve faze raziskav, razen z glivo *Laccaria bicolor*, nujno predstavljamo kot možne, torej z vprašajem ob imenu.

V raziskave posameznih tipov mikorize bo nujno v bodoče uvrščati analize deleža posameznega tipa v vsakem vzorcu (kot smo izvajali pri analizah mikoriznega potenciala rastišč) in analize vitalnosti mikorize (z uvajanjem novih tehnik dela, npr. metode vitalnega barvanja korenin s fluorescenčnimi barvili).

5. UGOTOVITVE

Onesnaževanje in propadanje gozdov se kaže med drugim v zmanjšani rasti in poškodovanosti kratkih korenin in mikorize. Ektomikorizo smreke je mogoče identificirati na podlagi morfoloških in anatomskih značilnosti plašča, ki ga tvorijo glivne hife na površini korenine, Hartigove mreže, ki jo tvorijo glivne hife med celicami primarne skorje, in izhajajočih elementov, hif in rizomorfov.

Razvoj in oblika plašča in mreže sta odvisna od vrste simbiotske glive na posameznem gostitelju, fiziološkega stanja rasti in dormance mikorize ter dejavnikov okolja. Onesnaževanje vpliva na spremembe v vrstni sestavi in frekvenci mikoriznih gliv, na delež mikoriznih korenin pri rastlini ter na vitalnost mikoriznih korenin.

V prvi fazi raziskav ektomikorize pri smreki v različno onesnaženih okoljih je bil poudarek na razvoju nekaterih metodoloških pristopov pri laboratorijskem in terenskem zasledovanju razvitosti mikorize pri smreki.

Tehnični pogoji v laboratoriju za gozdno biologijo na IGLG pogojujejo uvajanje posameznih tehnik dela s sterilnimi kulturami. V danih pogojih je bilo uspešno gojenje večine vrst in

sojev gliv iz kolekcije ektomikoriznih gliv na trdnem Melin-Norkransovem mediju, polovična jakost, modificiranem po Marxu (Marx, 1969).

Produkcija inokuluma v opisani rastni podlagi je uspešna, ravno tako inokulacija površinsko steriliziranih semenk smreke v sterilnih pogojih (v erlenmajer bučkah) in sterilno zraslih semenk v polsterilnih pogojih (v petrijevih posodah). Prenos inokuluma za inokulacijo semenk smreke v nesterilnih pogojih v rastlinjaku pa, predvsem zaradi neugodnih temperaturnih in svetlobnih razmer, ni bil uspešen. Žal je poleg inokulacije smreke v drevesnici zadnji način edini, pri katerem je možno pridobiti večje število inokuliranih semenk smreke hkrati.

Metoda določanja deleža mikoriznih korenin pri sadikah s poskusnih ploskev na terenu je primerljiva metodam drugih avtorjev. O rezultatih, zmerni do dobri razvitosti mikorize na ploskvah v Zavodnjah in zmerni do slabi razvitosti mikorize na ploskvah v Mislinjskem jarku, razpravljamo predvsem glede na ugotovitve Goeblove (1986), da se pri dobri preskrbljenosti z mineralnimi hranili, ko je mikoriza normalno slabše razvita (primer v Mislinjskem jarku), in dodatnih začetnih vplivih kislih padavin, delež mikorize zmanjša lahko za 50%.

Z vorčenjem mikorize v organskih horizontih tal in pri naravnem mladju smreke smo preizkusili nekaj metod in se odločili za vzorčenje po petih vzorcev tal znanega volumna z različnih lokacij na posamezni ploskvi. V teh vzorcih smo določali skupni delež in tipe mikorize. Analize smo dopolnili z analizami mikoriznega potenciala tal, ki se je izkazal za uspešno in enostavno metodo dela, vendar bo potrebno v bodoče tovrstne poskuse zastaviti v zgodnejših spomladanskih mesecih, da se bo mikoriza lahko do konca vegetacijske dobe bolj razvila.

Pri zadnjih analizah smo določali tudi deleže posameznih tipov mikorize. Določili smo nekaj tipov, katere tudi tuji avtorji opisujejo na bolj onesnaženih področjih (npr. *Cenococcum geophilum*, *Laccaria* vrste, *Paxillus involutus*, *Russula ochroleuca*). Pri analizah mikoriznega potenciala rastišč je potrebno upoštevati starost testnega materiala (semenk smreke), ki dodatno pogojuje naselitev in razvoj posameznih tipov mikorize.

Pri identifikaciji in karakterizaciji ektomikorize smo se v nalogi omejili na prikaz mikorize smreke z glivo *Laccaria bicolor*, ter na dodaten slikovni material, ki je povezan z razlago nekaterih pojmov pri tem delu. Pri tem opozarjamo zlasti na naslednje probleme: i) delo je potrebno izvajati na svežem materialu; ii) identifikacija, predvsem pa karakterizacija sta metodološko izredno zamudni tehniki dela; iii) za natančno in zanesljivo identifikacijo je potrebna večletna praksa na tem

področju, vključno s spoznavanjem značilnosti umetno sintetizirane mikorize in z zasledovanjem mikorize neposredno pod sporokarpi s terena.

Kljub naštetim problematiki pa je metode identifikacije in karakterizacije možno vpeljati, oziroma je že v postopku vpeljevanja v redno delo raziskav mikorize na IGLG v Ljubljani.

6. POVZETEK

Onesnaževanje in propadanje gozdov se kažeta med drugim v zmanjšani rasti in poškodovanosti kratkih korenin in mikorize. Pri ektomikorizi smreke rastejo glivne hife po površini korenine kot plašč ter med celicami primarne skorje, kjer tvorijo t.i. Hartigovo mrežo. Razvoj in oblika plašča in mreže sta odvisna od vrste simbiotske glive, fiziološkega stanja dormance in rasti mikorize ter dejavnikov okolja. Onesnaževanje vpliva na spremembe v vrstni sestavi in frekvenci mikoriznih gliv, na delež mikoriznih korenin pri rastlini ter na vitalnost mikoriznih korenin.

V prvi fazi raziskav je bil poudarek na razvoju naslednjih metodoloških pristopov pri terenskem in laboratorijskem zasledovanju razvitosti in tipov mikorize pri smreki:

- i) metode vzorčenja mikoriznih sadik smreke, primerjalne analize razvitosti mikorize na močno onesnaženem področju (Zavodnje) in relativno neonesnaženem področju (Mislinja);
- ii) metode vzorčenja naravnega mladja smreke in organskih horizontov tal za primerjalne analize razvitosti in tipov mikorize na petih različno onesnaženih področjih v okolici Šoštanja (oboje modif. po Stroo *et al.*, 1988);
- iii) analize mikoriznega potenciala organskih horizontov tal in tipov mikorize s teh istih ploskev (Kropaček *et al.*, 1989);
- iv) izolacija micelija iz sporokarpov gliv z istih ploskev ter gojenje kolekcije mikoriznih gliv *in vitro*;
- v) metode produkcije inokuluma in umetne inokulacije semenk smreke z micelijem gliv iz kolekcije, v sterilnih, polsterilnih in nesterilnih pogojih v rastlinjaku;
- vi) metode morfoloških in histoloških analiz za identifikacijo in študij razvitosti mikorize (Agerer, 1987-1990).

Primerjalne analize razvitosti mikorize pri sadikah smreke so pokazale na večji delež mikoriznih korenin v bolj onesnaženem področju (Zavodnjah glede na Mislinjo), verjetno zaradi ugodnejših svetlobnih razmer na poskusnih ploskvah v Zavodnjah. Popolnejše rezultate dajo kombinirana vzorčenja naravnega mladja, organskih horizontov tal in mikoriznega potenciala teh tal ter identifikacije ektomikorize: na najbolj onesnaženih

področjih prevladujejo predvsem tipi *Cenococcum geophilum*, *Laccaria amethystina*, *Paxillus involutus*, na manj onesnaženih so poleg teh prisotne *Cantharellus tubaeformis*, *Lactarius detterimus*, posamezne vrste rodu *Amanita*, *Cortinarius*, *Xerocomus* in več neidentificiranih tipov. Inokulacija semenk smreke *in vitro* je bila uspešna predvsem z glivo *Laccaria bicolor*, katero smo morfološko in histološko karakterizirali za nadaljnje identifikacije.

7. SUMMARY

The impacts of air pollution on forest decline are recognized among other signs as reduced growth and damages of short roots and of mycorrhiza. The ectomycorrhiza of spruce is characterized by the formation of a fungal sheath around the short root and the Hartig net, where the fungal hyphae form a net-like structures around the cortical cells. The morphology and anatomy of the sheath, the Hartig net and the emanating hyphae and rhizomorphs depend on the fungal species on each host plant roots, the physiological conditions of activity or dormancy of the mycorrhiza and the environmental influences. Pollution can influence the fungal species composition and abundance, the mycorrhization of the roots and vitality of mycorrhizas.

In the first phase of this research project we were mainly concerned with the development and introduction of several methodological approaches at the field and laboratory work on research of ectomycorrhizae on spruce, such as:

- i) sampling methods of mycorrhizal spruce seedlings on heavily polluted (Zavodnje) versus relatively less polluted site (Mislinja);
- ii) sampling methods of natural occurring spruce seedlings and the humus soil layers for comparative analyses of mycorrhization and mycorrhizal types on five differently polluted field plots nearby the Thermoenergetic Plant in Šoštanj (both modified after Stroo *et al.* (1988));
- iii) mycorrhizal inoculum potential analyses of the same humus soil layers, with analyses of mycorrhizal types (after Kropaček *et al.*, 1989);
- iv) isolation of mycelium from the sporocarps of fungi, collected at the same plots, and techniques of culturing ectomycorrhizal fungi *in vitro*;
- v) methods of fungal inoculum production and inoculation procedures for spruce seedlings in sterile, half sterile and non sterile conditions in a glasshouse;
- vi) methods of morphological and histological analyses for identification and developmental studies of ectomycorrhizae on spruce (after Agerer, 1987-1990).

Comparative analyses of mycorrhization of spruce seedlings showed bigger percentage of mycorrhization at more polluted sites (in Zavodnje in comparison to Mislinja), which is probably due to better light conditions on the field plots in Zavodnje. More comprehensible results show the combined samplings of natural mycorrhizal spruce seedlings, humus soil layers and mycorrhizal inoculum potential analyses of these soils and the identifications of ectomycorrhizae: on most polluted sites the prevalent mycorrhizal types are *Cenococcum geophylum*, *Laccaria amethystina*, *Paxillus involutus*, on less polluted sites we found also *Cantharellus tubaeformis*, *Lactarius detterimus*, several *Amanita*, *Cortinarius*, *Xerocomus* species and some unidentified types. Inoculation *in vitro* was successful predominantly with fungus *Laccaria bicolor*, which is further morphologically and histologically characterized for future identifications.

8. LITERATURA

- AGERER, R. (1987-1990) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Munchen.
- AGERER, R. (1988) Studies on ectomycorrhizae XVII. The ontogeny of ectomycorrhizal rhizomorphs of *Paxillus involutus* and *Thelephora terrestris* (Basidiomycetes). *Nova Hedwigia* 47:311-334.
- AL ABRAS *et al.* (1988) Morphological and physiological changes in ectomycorrhizae of spruce (*Picea excelsa* (Lam.) Link.) associated with ageing. *New Phytol.* 110:535-540.
- ARNOLDS, E. (1988) The changing macromycete flora in the Netherlands. *Trans.Br.Mycol.Soc.* 90:391-406.
- BAREA, J.M. (1986) Importance of hormones and root exudates in mycorrhizal phenomena. In 'Mycorrhizae: physiology and genetics.' 1st ESM, Dijon, 1.-5.July 1985. pp.177-187. INRA, Paris.
- BLANK, L.W. *et al.* (1988) New perspectives on forest decline. *Nature* 336:27-30.
- BLASCHKE, H. (1986) Einfluss von saurer Beregnung und kalkung auf die Biomasse und Mykorrhizierung der Feinwurzeln von Fichten. *Forstw.Cbl.* 105:324-329.
- CURL, E.A., TRUELOVE, B. (1986) The Rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- DAUGHTRIDGE, A.T. *et al.* (1986) A rapid staining technique for assessment of ectomycorrhizal infection of oak roots. *Can.J.Bot.* 64:1101-1103.
- DIXON, R.K. *et al.* (1988) Cytokinins in the root pressure exudate of *Citrus jambhiri* Lush. colonized by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Tree Physiology.* 4:9-18.
- FELLNER, R. (1989) Mycorrhizae - forming fungi as bioindicators of air pollution. *Agric., Ecos., Env.* 28:115-120.
- FORTIN, J.A. (1970) Interaction entre Basidiomycetes mycorrhizateurs et racines de pin en presence d'acide indol-3cyl acetique. *Physiologia Pl.* 23:365-371.

- FRANK, A.B. (1885) Ueber die auf wurzelsymbiose beruhende ernahrung gewisser baeume durch unterirdische pilze. Ber.dt.bot.Ges.3: 128-145.
- GARRETT, H.E. *et al.* (1982) The effects of ozone and sulfur dioxide on respiration of ectomycorrhizal fungi. Can.J.For.Res. 12:141-145.
- GAY, G. (1988) Roles des hormones fongiques dans l'association ectomycorrhizienne. Cryptogamie, Mycol. 9:211-219.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. (1984) Host-Fungus Specificity, Recognition and Compatibility in Mycorrhizae. In 'Genes involved in Microbe-Plant Interactions' (Eds.Verma.D.& Hohn,T.H.) pp.225-254.
- GOGALA, N. (1971) Einfluss der natuerlichen Cytokinine von *Pinus sylvestris* L. und andere Wuchsstoffe auf das mycelwachstum von *Boletus edulis* var. *pinicolus* Vitt. Ost.Bot.Z.118:321-333.
- GOBL, F. (1986) Wirkung simulierter saurer Niederschlage auf Boden und Fichtenjungpflanzen in Gefassversuch. III.Mykorrhizauntersuchungen. Cbl.Ges.Forstwesen 103:89-107.
- GRAND, L.F., HARVEY, A.E. (1984) Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. In 'Methods and Principles of Mycorrhizal Research' (Eds.N.C.Schenk) Am.Phytopath.Soc., St.Paul, Minnesota, pp.157-164.
- GREENE, E.M. (1980) Cytokinin production by microorganisms. Bot.Rev. 46:25-74.
- GRONBACH, E. (1988) Charakterisierung un Identifizierung von Ektomykorrhizen in einem Fichtenbestand mit Untersuchungen zur Merkmalsvariabilitaet in sauer beregneten Flaechen. Bibl.Mycol. 125:1-216.
- HACSKAYLO, E. (1973) Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In 'Ectomycorrhizae' (Eds. G.C.Marks & T.T.Kozlowski) Academic Press, New York and London.pp.207-230.
- HARLEY, J.L., SMITH, S.E. (1983) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London, New York.
- HARLEY, J.L., HARLEY, E.L. (1987) A Check-List of Mycorrhiza in the British Flora. New Phytol. (Suppl.) 105:1-102.

- HAYNES, R.J. 1980) Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants. *Bot.Rev.*46:75-99.
- KOTTKE, I., OBERWINKLER, F. (1986) Mycorrhiza of forest trees - structure and function. *Trees* 1:1-24.
- KOWALSKI, S. *et al* (1989) Mycorrhizal species composition and infection patterns in forest plantations exposed to different levels of industrial pollution. *Agric.,Ecos.,Env.*28:249-255.
- KROPAČEK, K. *et al* (1989) The mycorrhizal inoculation potential of forest soils exposed to different pollution stress. *Agric., Ecos.,Env.*28:271-277.
- LAST,F.T. *et al.* (1987) Successions of Sheathing Mycorrhizal Fungi. *TREE* 2:157-161.
- LYFORD, W.H. (1975) Rhizography of Non-woody Roots of Trees in the Forest Floor. In 'The Development and Function of Roots' (Eds.J.G.Torrey & D.F.Clarkson) Academic Press. London, New York, San Francisco.pp.179-196.
- MARKS,G.C., FOSTER,R.C. (1973) Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In 'Ectomycorrhizae' (Eds.G.C.Marks & T.T.Kozlowski) Academic Press. New York, London.pp.1-41.
- MARX, D.H. (1969) Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153-163.
- MARX, D.H., BRYAN, W.C. (1971) Formation of ectomycorrhizae on half-sib progenies of slash pine in aseptic culture. *For.Sci.*17: 488-492.
- MC COOL, P.M. (1988) Effect of air pollutants on mycorrhizae. In 'Air Pollution and Plant Metabolism' Proc. of the 2nd Int.Symp. on Air Pollution and Plant Metabolism, Munich, FRG, 6.-9-4.1987. Elsevier Appl. Sci. London, New York.pp.356-365.
- MELIN, E. (1962) Physiological aspects of mycorrhizae of forest trees. In 'Tree Growth' (Eds. T.T.Kozlowski) Ronald Press, New York.pp.247-263.
- METZLER, B., OBERWINKLER, F. (1987) The in-vitro-mycorrhization of *Pinus sylvestris* L. and its dependence on the pH-value. *Eur.J.For.Path.*17:385-397.

- MEYER, F.H. (1973) Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In 'Ectomycorrhizae' (Eds.G.C.Marks & T.T.Kozlowski) Academic Press, new York, London.pp.79-105.
- MILLER, O.K.Jr. (1982) Ectomycorrhizae in the Agaricales and Gasteromycetes. Can.J.Bot.61:909-916.
- MOSER, M. (1978) Die Rohrlinge und Blatterpilze. In 'Kleine Kryptogamenflora' (Eds.H.Gams) Iib/2.3.Aufl.Fisher, Stuttgart.
- NYE, P.H., TINKER, P.B. (1977) Solute Movement in the Soil / Root System. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- NYLUND, J.E. (1987) The ectomycorrhizal infection zone and its relation to acid polysaccharides of cortical cell walls. New Phytol.106:505-516.
- NYLUND, J.E., UNESTAM, T. (1982) Structure and Physiology of Ectomycorrhizae. I.The process of mycorrhiza formation in Norway spruce *in vitro*. New Phytol.91:63-79.
- REICH, P.B. *et al.* (1985) Effects of ozone, silfur dioxide and acidic rain on mycorrhizal infection in northern red oak *Quercus rubra* seedlings. Can.J.Bot.63:2049-2055.
- REICH, P.B. *et al.* (1986) Acid rain and ozone influence mycorrhizal infection in tree seedlings. J.Air Pollut.Control Assoc. 36:724-726.
- SCHLECHTE, G. (1986) Zur Mykorrhizapilzflora in geschadigten Forstbestanden. Zeitschrift fur Mykologie.52:225-232.
- SCHUTT, P. (1984) Der Wald stirbt an Stress. Bertelsmann Verlag, Munchen.pp.1-32.
- SHAFER, S.R. *et al.*(1985) Formation of ectomycorrhiza on *Pinus taeda* seedlings exposed to simulated acidic rain. Can.J.For.Res. 15:66-71.
- STROO, H.F., ALEXANDER, M. (1985) Effect of simulated acid rain on mycorrhizal infection of *Pinus strobus*. Water, Air, Soil Pollut.25: 107-114.
- STROO, H.F. *et al.* (1988) Effects of ozone and acid rain on white pine *Pinus strobus* seedlings grown in five soils. II. Macorrhizal infection. Can.J.Bot.66:1510-1516.

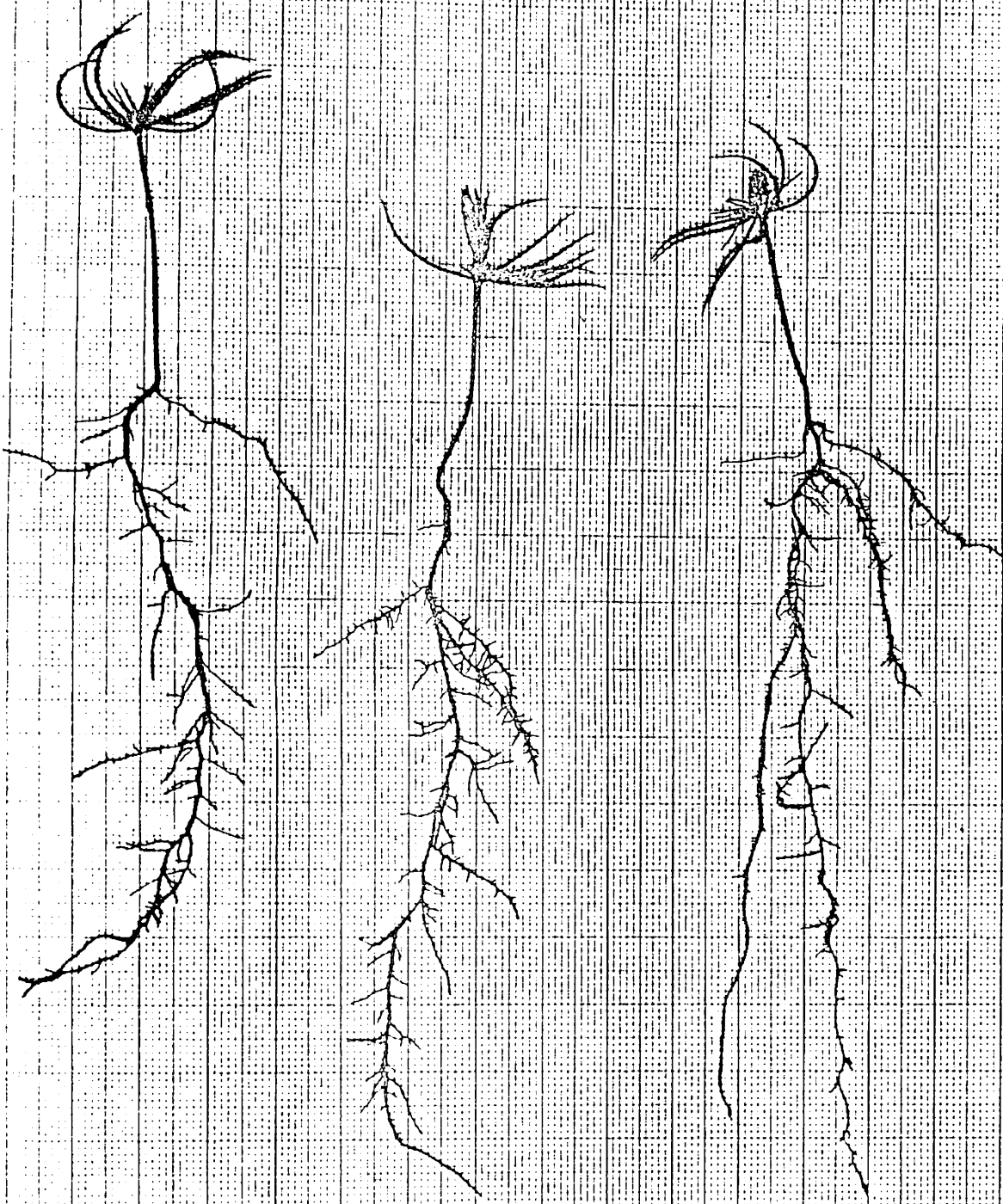
- STRZELCZYK, E., KEMPERT, M. (1987) Effect of B-Group Vitamins on Cytokinin-Like Substances Production by Ectomycorrhizal Fungi of Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Symbiosis* 3:135-146.
- TESTER, M. *et al.* (1987) The phenomenon of 'nonmycorrhizal' plants. *Can.J.Bot.* 65:419-431.
- TORTIĆ, M. (1987) Main Characters of the Mycoflora in Forests of *Pinus peuce* Griset. *Acta Bot.Croat.* 46:145-151.
- TRAPPE, J.M. (1962) Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot.Rev.* (Okt.-Dec.1962) 538-587.
- TREU, R. (1990) Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen aus dem Nationalpark Berchtesgaden. *Bibl.Mycol.* 134: 1-196.
- UHL, M. (1988) Identifizierung und Charakterisierung von Ektomykorrhizen an *Pinus sylvestris* und Ektomykorrhizen aus der Gattung *Tricholoma*. Dissertation, Munchen.pp.1-254.
- WEISS, M. (1988) Ektomykorrhizen von *Picea abies*. Synthese, Ontogenie und Reaktion auf Umweltschadstoffe. Dissertation, Munchen.pp.1-141.
- WEISS, M., AGERER, R. (1988) Studien an Ektomykorrhizen XII. Drei nichtidentifizierte Mykorrhizen an *Picea abies* (L.) Karst. aus einer Baumschule. *Eur.J.For.Path.* 18:26-43.
- WILSON, B.F. (1975) Distribution of Secondary Thickening in Tree Root Systems. In 'The Development and Function of Roots' (Eds.J.G.Torrey & D.T.Clarkson) Academic Press. London, New York, San Francisco.pp.197-220.
- ZAK, B. (1971) Characterization and Identification of Douglas-Fir Mycorrhizae. In 'Mycorrhizae' (Eds.E.Hacskeylo) Proc.1st NACOM, US Gov.Printing Office, Washington,DC.pp.38-53.
- ZAK, B. (1973) Classification of Ectomycorrhizae. In 'Ectomycorrhizae' (Eds.G.C.Marks & T.T.Kozlowski) Academic Press. New York, London.pp.43-78.

Priloge

Naloga 1/1 Mesečni popisni obrazec pri poskusu inokulacije semenk smreke z mikoriznimi glivami

SEMIČNI POPISNI OBRABEC PRI POSKUSU INOKULACIJE SEMENK SMREKE Z MIKORIZNIMI GLIVAMI PRI NALOZI ST.187

Številka probenca	DRV mm	Ls cm	Lzg cm	Lk cm	Ts g	Tzg g	Tk g	St. lk	St. kk	St. mk	Mi g	Mpr. %	Opombe
K/1	0.5	10.2	3.2	7.0	0.0440	0.0290	0.0150	3	18	—			
K/2	0.5	11.5	3.5	9.0	0.0590	0.0320	0.0270	7	8	—			
K/3	0.7	14.9	3.0	11.9	0.0570	0.0370	0.0200	5	15	—			
KA/1	0.6	12.8	3.0	9.6	0.0520	0.0340	0.0280	7	12	—			
KA/2	0.6	14.0	4.0	10.0	0.0760	0.0400	0.0360	7	9	—			
KA/3	0.6	15.0	3.0	12.0	0.1020	0.0510	0.0510	12	11	—			
039A/1	0.6	12.4	3.0	9.4	0.0600	0.0360	0.0240	3	30	—			
039A/2	0.7	13.6	3.8	9.8	0.0870	0.0470	0.0400	6	23	—			
039A/3	0.5	19.7	2.0	17.7	0.0630	0.0270	0.0360	5	27	—			
039/1	0.8	14.3	3.5	11.3	0.1000	0.0480	0.0520	6	42	5	11.9		
039/2	0.7	15.0	3.2	11.8	0.1140	0.0600	0.0540	6	30	4	5.7	7.4	na korak
039/3	0.7	15.6	3.2	12.4	0.0920	0.0540	0.0380	7	36	3	4.5		
033/1	0.6	7.2	2.8	4.4	0.0630	0.0430	0.0200	5	36	—			
033/2	0.6	12.6	2.7	9.9	0.0890	0.0490	0.0400	8	26	—			
033/3	0.7	21.1	2.5	18.6	0.0870	0.0470	0.0400	8	28	—			
044/1	0.7	12.6	3.1	10.5	0.0980	0.0530	0.0480	8	25	—			
044/2	0.6	15.9	3.5	12.4	0.0830	0.0370	0.0460	3	16	—			
044/3	0.6	12.7	3.0	15.7	0.0790	0.0400	0.0390	10	36	—			
037/1	0.6	14.6	2.5	11.1	0.0810	0.0360	0.0480	8	37	—			
037/2	0.6	12.2	2.9	12.0	0.0900	0.0420	0.0450	8	27	—			
037/3	0.7	21.1	4.0	16.1	0.1200	0.0640	0.0560	8	42	—			
083/1	0.6	11.3	3.2	8.1	0.0790	0.0330	0.0460	4	13	—			
083/2	0.6	15.5	2.5	12.0	0.0690	0.0320	0.0280	4	40	—			
083/3	0.8	24.6	2.8	21.7	0.1220	0.0500	0.0740	2	30	—			
008/1	0.7	13.8	3.0	10.2	0.0600	0.0320	0.0320	4	28	2	7.4		
008/2	0.8	17.5	2.8	14.7	0.0810	0.0410	0.0400	3	42	—			
008/3	0.7	21.0	3.2	17.8	0.1000	0.0630	0.0410	13	30	—			
039d.	0.6	11.0	3.4	10.6	0.0730	0.0430	0.0240	5	35	3			



Priloga 1/2 Fotokopija semenk iz tega vzorčenja, gliva 039

MIKORIZNOST

Kurz 170, 187

UZORČENJE ST.:

MISLINJA

DATUM UZORČENJA:

VZ. 1

SADIKIJA:

1/1

DATUM OBDELAVE 19. 10. 1970

Št. k.	Dolž. l. (cm)	Št. k.k.	Št. k.k. /cm	$\overline{kk/cm}$	Št. M.k.	% Mi	% Mi prčno	Opomba
1	5.5	12	2.2		2	16.7		
2	6.1	17	2.8	2.1	3	17.6	16.0	
3	6.3	29	4.6		4	13.2		

VZ. 2

SADIKIJA:

1/2

DATUM OBDELAVE

Št. k.	Dolž. L	Št. k.k.	kk/cm	$\overline{kk/cm}$	Št. M.k.	% Mi	% Mi prčno	Op.
1	5.4	25	4.6		2	27.8		
2	6.6	29	4.4	3.6	15	24.2	24.3	
3	6.4	32	5.0		20	24.8		

VZ. 3

SADIKIJA:

1/3

DATUM OBDELAVE

Št. k.	Dolž. L	Št. k.k.	kk/cm	$\overline{kk/cm}$	Št. M.k.	% Mi	% Mi prčno	Op.
1	6.0	20	3.3		—			
2	4.7	16	3.4	3.7	—		6.2	
3	4.7	20	4.3		13	19.6		

osnove in navodila:

V okolici Šoštanja smo 14.6.1990 vzeli vzorce organskih horizontov tal s petih ploskev. Vzorce smo presejali skozi 2mm sito in vsakega razdelili na večji del (v velikem lončenem loncu) in manjši, avtoklavirani del (v malem plastičnem loncu). Semena smreke smo površinsko sterilizirali in zasejali v lonce v plastenjaku. Kjer semena niso vzknila, smo jih dopolnili v juliju 1990. Lonce smo vlažili avtomatično, po prestavitvi izven plastenjaka (v oktobru) pa ročno po potrebi.

V decembru potekajo analize mikoriznega potenciala petih ploskev. Semenske smreke pazljivo izkopljemo iz zemlje: lonec po potrebi prevrnemo, pazljivo odstranimo po pet semenk smreke, ostale semenke pa zakopljemo nazaj. Semenske namočimo v vodi v hladilniku, najdlje za 24 ur. Pazimo na oznake ploskev!

Pri vsaki semenki najprej preštejemo vse kratke korenine (daljše od 2mm) in določimo mikorizne kratke korenine ter izmerimo dolžino vseh lateralnih korenin. Izračunamo število kratkih korenin na cm lateralne in % mikoriznih kratkih korenin od vseh kratkih korenin v vzorcu. Med opombe vpišemo tip mikorize.

Semenke narahlo popivnemo, postavimo na milimetrski papir v plastični 'srajčki' (pazimo, da se posamezne lateralne korenine ne prekrivajo), jih fotokopiramo in označimo fotokopije z oznako vzorca; mikorizne kratke korenine na fotokopiji obarvamo. Pazimo, da se korenine ne izsušijo!

Izmerimo debelino na koreninskem vratu (s kljunatim merilcem), skupno dolžino in težo semenke, dolžino in težo poganjka, dolžino in težo korenin ter število in dolžino lateralnih korenin. Korenine vseh petih semenk shranimo začasno v vodi v hladilniku, po analizah tipov mikorize pa v fiksirju FAA (70% etanol : ocetna k. : formalin ; 99:5:5). Vsako fijočo s koreninami označimo zunaj z nalepke in v fijoči s koščkom paus papirja.

Legenda:

- Vz. = oznaka vzorca
- DKV = debelina na koreninskem vratu (mm)
- Ls = skupna dolžina semenke (cm)
- lp = dolžina poganjka (semenke brez korenin) (cm)
- Lk = dolžina korenin (cm)
- Ts = skupna teža semenke (g)
- Tp = teža poganjka (g)
- Tk = teža korenin (g)
- L = dolžina vseh lateralnih korenin (cm)
- S = število vseh lateralnih korenin (daljših od 15mm)
- Kk = število vseh kratkih korenin (dolžine 2 do 15mm)
- K/L = število kratkih korenin na 1 cm lateralne korenine
- Mk = število mikoriznih kratkih korenin
- %M = delež mikoriznih korenin od vseh kratkih korenin v vz.