

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V1-0296

3. Naslov projekta:

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Oprelitev stanja biotske raznovrstnosti gozdnih talnih ekosistemov - vzpostavitev in standardizacija metodologije ter baz podatkov in aplikacije na izbranih gozdnih raziskovalnih ploskvah

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Biodiversity assessment of forest soil ecosystems - set-up and standardisation of methodology and databases with their application at the selected forest research plots

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

biotska raznovrstnost, gozd, tla, ektomikoriza, pedofavna, bakterije v mikorizosferi, standardizacija metodologije, baze podatkov

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

biodiversity, forest, forest soil, ectomycorrhiza, pedofauna, bacteria in mycorrhizosphere, methodology standardisation, databases

REPUBLIKA SLOVENIJA
NOSILEC JAVNEGA POOBLASTILA
JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
REPUBLIKE SLOVENIJE, LJUBLJANA

Prejeto:

30-09-2008

Šifra zadeve:

63113-284/2008

Sig. z:

0110

Pril:

Vrednot:

13

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

0404 - Gozdarski inštitut Slovenije

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

0481 - Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

6. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo okolje in prostor

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

21242

dr. Tine Grebenc

Datum: 30.09.2008

Podpis vodje projekta:

dr. Tine Grebenc



Podpis in žig izvajalca:

v.d. direktorja dr. Tomislav Levanič

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

V času trajanja projekta smo s strani sodelavca dobili namig in ponudbo, da med cilje (pretežno metodološki del) vključimo tudi vretenčarske organizme. Večje živali (vretenčarji) so namreč tako prehransko (vir hrane, transport hranil in iztrebljanje), kot bivanjsko, tesno vezani na gozdna tla, zato smo se odločili, da v pregled metodologije gozdnih tal vključimo tudi del študije biotske pestrosti gozdnih ekosistemov na primeru redkih in ogroženih vrst kot so gozdne kure (divji petelin, ruševac, gozdni jereb). Gostota teh vrst v zadnjih desetletjih po vsej Evropi vztrajno upada, zato je njihovo poznavanje (populacijska dinamika), poznavanje prehranskih navad in s tem potencialnega vpliva na gozdna tla še dodatno zanimivo in upravičeno. Poleg tega so zaradi specifičnosti njihovih habitatov in občutljivosti na spremembe v gozdnih ekosistemih jih raziskovalci priznavamo kot indikatorje spreminjanja biotske pestrosti gozdov. Dodaten vsebinski prispevek ni negativno vplival na izvajanje in obseg dela na prvotno zastavljenih ciljih.

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

UVOD

Gozdovi pokrivajo okoli 3/5 celotne Slovenije, kar uvršča državo med najbolj gozdnate države v Evropi. Bukev predstavlja eno najbolj ohranjenih vrst, gozdovi z bukvijo pa približno 2/3 vseh gozdov v Sloveniji. Velik pomen ima vrsta tudi v širšem evropskem prostoru. V Sloveniji je bila vrsta, oziroma tip gozda s prevladujočo bukvijo, že vključena v številne raziskave (predhodne in tekoče), tako za gozdove z bukvijo v Sloveniji obstaja precej kvalitetnih podatkov, kar nam omogoča uporabo vrste za modelno drevesno vrsto za slovenske in srednjeevropske gozdove.

Ena od značilnosti gozdov zmerne pasu je velika raznovrstnost flore in favne, ki je med drugim tudi odraz različnih klimatskih vplivov, reliefne ter geološke pestrosti. Raznovrstnost flore in favne ter poznavanje glivnih in bakterijskih združb je v Slovenskih gozdovih v veliki meri slabo ocenjena, podcenjena, podatkov o biotski raznovrstnosti nekaterih skupin organizmov v gozdnih tleh pa sploh ni. Funkcije talnih organizmov so pomembne na ekosistemskem, krajinskem, regionalnem in globalnem nivoju. Ocena biodiverzitete tal postaja tudi del ocene trajnostnega gospodarjenja s tlemi (Andre in sod. 2001) in pomembno prispeva k ocenam celokupne biotske raznovrstnosti. Raziskave odziva tal ter vplivi motenj v okolju in človekove dejavnosti so pogosto slabo raziskane saj temeljijo na zahtevni določitvi celokupne biodiverzitete ekosistema. Najbolj naseljeni so vrhnji horizonti tal, kjer potekajo tudi najbolj intenzivni procesi in z njimi povezane funkcije gozdnih tal: degradacija organskega materiala, kroženje hranil, proizvodnja in poraba plinov, degradacija polutantov ter razvoj in ohranitev fizikalne strukture (Coleman in Crossley 1996). Naštete funkcije vršijo (mikro)organizmi v tleh v vseh ekosistemih, vendar se močno razlikujejo v pogledu ekspresije (na vrstnem in populacijskem nivoju) in njihove regulacije. V gozdovih zmerne pasu je dekompozicijska komponenta tal še posebej poudarjena, dekompozitorji pa poleg simbiotov lahko predstavljajo večinski del biomase in biotske raznovrstnosti v tleh (Albert 1979)

Za ohranitev biotske raznovrstnosti in varstva genskih virov ter njihovih fizioloških odgovorov, so s stališča varstva narave in biotske raznovrstnosti še posebej pomembni pragozdni ostanki, kot najbolj ohranjeni deli gozda z rastjem velike starosti (ARSO 1998), pomembno pa na petrost in dinamiko vplivajo tudi naravno pojavljajoče se vrzeli v sicer sklenjenih sestojih pragozdnih ostankov. Kot primer sekundarnega pragozda smo izbrali raziskovalno ploskev v Rajhenavskem Rogu ter čim bolj primerljivo ploskev Snežna jama, v neposredni bližini pragozdne ploskve. Poznavanje dinamike in raznovrstnosti biotske komponente v tovrstnih sistemih z minimalnim človekovim vplivom omogoča pridobivanje pomembnih podatkov o dinamiki gozdnih tal v pretežno neokrnjenih ekosistemih in neprecenljive referenčne podatke za primerjave z ostalimi, bolj ali manj antropogeno spremenjenimi ploskvami.

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

OPREDELITEV NAMENA

Namen dela (delovne hipoteze):

1. opredelitev stanja in ohranjenost biotske raznovrstnosti v tleh gozdnih ekosistemov v pragozdnem rezervatu Rajhenavski Rog in primerljivih raziskovalnih ploskvah v bližini le tega in sicer za mikorizne glive, dekompozitorske glive na celulozi, bakterije na celulozi in pedofavno
2. Zbrati želimo obstoječe razdrobljene podatke o biotski raznovrstnosti gozdnih tal s stališča posameznih skupin organizmov na izbranih raziskovalnih ploskvah, kot model za postavitev metodologije ocene celokupne biotske raznovrstnosti. Dodatno želimo analizirati pestrosti posameznih skupin vključno z statističnimi primerjavami in s tem zapolniti vrzel poznavanja celokupne biotske raznovrstnosti različnih taksonomskih in funkcionalnih skupin organizmov, ki se pojavljajo v različnih tipih gozda v Sloveniji.
3. postavitev enotne metodologije analiz ter nabor pristopov/metod na izbranih ploskvah validirati. Osredotočili se bomo na celovito analizo raznovrstnosti glivne in bakterijske komponente, izbranih skupin pedofavne ter preliminarno tudi nekatere vrste vretenčarjev
4. postavitev standardizirane baze podatkov za izbrane analizirane skupine (oziroma dopolnitev in medsebojna uskladitev že obstoječih)
5. na osnovi pilotne študije na izbranih ploskvah (s poudarkom na ploskvi v pragozdnem rezervatu) bomo oceniti možnosti razširitve in dopolnjevanja metodologije ter prilagajanje na področje celotne države, na osnovi zastavljene in v talne analize že vključene bioindikatorske mreže.

PRIČAKOVANI REZULTATI

Rezultate predlaganega dela lahko razdelimo v rezultate, ki bodo doseženi v času trajanja predlaganega projekta in rezultate, ki bodo izhajali iz postavljene metodologije in bodo uresničeni kasneje:

- dopolnitev in posodobitev že obstoječe baze PCR-RFLP baze podatkov za ektomikorizne in saprofitske glive (askomicete in bazidiomicete)
- zbrani podatki o biotski raznovrstnosti in sukcesiji dekompozitorskih gliv v naravnem in gospodarskem gozdu na izbranih substratih, dopolnitev molekularne baze podatkov za ugotovljene vrste in dopolnitev baze podatkov za pojavljanje makromicet v Sloveniji (Boletus Informaticus, GIS)
- prvi primer analize bakterijskih združb v naravnih gozdnih ekosistemih za področje Slovenije, zasnova in postavitev standardizirane molekularne podatkovne baze za izbrane skupine bakterij
- dopolnitve javno dostopnih zbirk nukleotidnih zaporedij (GenBank) z nukleotidnimi zaporedji pridobljenimi v okviru predlaganega projekta
- zasnova in postavitev standardizirane baze podatkov za pojavljanje izbranih skupin pedofavne oz. dopolnitev in prilagoditev že obstoječih baz
- poenotenje baz in njihova skupna predstavitev (javna dostopnost)
- priprava enotne metodologije za analizo omenjenih komponent gozdnih tal. V prihodnje tudi možnost uporabe metodologije (v celoti ali izbrane metode) v več državah na območju EU, v okviru analiz indikatorskih ploskev (program Forest Focus in BioSoil)
- izračuni in ocene biotske raznovrstnosti za posamezne skupine organizmov in celokupne raznovrstnosti na izbranih raziskovalnih ploskvah Rajhenavski Rog (pragozd,

referenčna ploskev) in Snežna jama (primerljiv gospodarski gozd). V prihodnje tudi ocene biotske raznovrstnosti za del ali vse ploskve v okviru 45 ploskev bioindikatorske mreže na področju celotne Slovenije.

- vključitev dela vsebin predlaganega projekta v pripravljajoči projekt v okviru 7OP RTD EU program, z naslovom » Biodiversity assessment in target forest ecosystems around Mediterranean Basin with relation to History and Management «
- publikacija metodologije in rezultatov analiz v indeksirani domači in tuji znanstveni (in strokovni) literaturi, vsaj ena predstavitev na domačem in ena na tujem znanstvenem srečanju za vsako DS posebj in dodatne skupne predstavitve

Vse od zastavljenih ciljev (pričakovanih rezultatov) smo do zaključka projekta delno ali v celoti dosegli. Delno so v teku še postavitev baz podatkov za nekatere skupine organizmov (pedofavna, delno dekompozitorske glive in bakterije), medtem ko smo bistveni cilj, torej postavitev metodologije in njeno validacijo na izbranih raziskovalnih ploskvah, v celoti izvedli. Metodologijo podrobneje predstavljamo v nadaljevanju poročila.

METODOLOGIJA

Pri uresničevanju zastavljenih ciljev smo uporabili naslednje osnovne pristope, ki smo jih prilagodili naravi zastavljenih ciljev, jih v nekateri primerih dopolnili glede na skupino analiziranih organizmov ter iz njih izhajali pri pripravi rezultatov projekta: izbor ploskev in podploskev (izbor dveh reprezentativnih in primerljivih ploskev); pregled obstoječe literature; zbiranje podatkov v metapodatkovnih bazah; vzorčenja in popisi na terenu; laboratorijska analiza ektomikorize; molekularni pristopi pri analizah izbranih skupin (PCR-RFLP, DGGE, sekvenciranjem); ločevanje izbranih taksonomskih skupin pedofavne, preučevanje in identifikacija na osnovi morfoloških lastnosti; analize in preliminarne interpretacije dobljenih rezultatov; izračuni biotske raznovrstnosti posameznih taksonomskih skupin in združevanje rezultatov v skupno oceno, glede na razpoložljive rezultate projekta; priprava enotne metodologije (po taksonomskih skupinah) za oceno biotske raznovrstnosti, kot bistveni cilj projekta. O opravljenem delu smo sproti pripravljali vsebinska poročila in predstavljali in publicirali dobljene rezultate dela.

Pretežni del eksperimentalnih nalog na terenu smo opravili na raziskovalni ploskvi GIS v pragozdnem rezervatu Rajhenavski Rog (45° 40' N, 15° 01' E). Raziskovalno ploskev smo postavili v južnem delu pragozdnega rezervata Rajhenavski Rog, na nadmorski višini med 850 in 900 m. Lokalna klima je montanska dinarska, povprečna letna količina padavin je okoli 1500 mm, povprečna januarska temperatura -2°C in povprečna julijska 17°C, povprečna letna 8°C (Kraigher in sod., 2002). Kameninska osnova je kredni apnenec, tla na ploskvi in v okolici pa prekrivajo različni tipi tal: folični histozoli, litični, eutrični in rendzični leptozoli, eutrični kambizol in haplični luvizol (Urbančič in sod., 2004). Preiskovani del pragozdnega rezervata spada v dinarski jelovo bukov gozd, v katerem prevladujejo mezofilne vrste. V sestoji najdemo jelko (*Abies alba* Mill.) in bukev (*Fagus sylvatica* L.), v neposredni okolici preiskovanega dela pa tudi posamezna (redka) drevesa gorskega javora (*Acer pseudoplatanus* L.). Na področju pragozdnega rezervata se v manj kot enem odstotku celotne lesne biomase pojavljajo še smreka (*Picea abies* (L.) Karst), brest (*Ulmus glabra* Huds.) in lipovec (*Tilia cordata* Mill.), ki so bili od raziskovalne ploskve dovolj oddaljeni, da niso imeli na področje značilnega vpliva. Kot enega od raziskovalnih vprašanj smo si zastavili tudi vpliv vrzeli na dinamiko talnih

organizmov, tako smo na ploskvi kot vrzel upoštevali ca 8 let staro vrzel, ki je nastala kot posledica ujme.

Kot drugo (primerljivo) raziskovalno ploskev (lokalno ime Snežna jama) smo izbrali v neposredni bližini Rajhenavskega Roga, ca 1km (zračne razdalje) (jugo)vzhodno. Ploskev smo izbrali tako, da je bila po reliefu, položaju in rastiščnih razmerah primerljiva s ploskvijo v Rajhenavskem Rogu. Ploskev spada v dinarski jelovo bukov gozd, z večjim deležem bukve in posameznimi smrekami v okolici ploskve, ki pa so dovolj oddaljene, da je bil njihov vpliv na raziskovalno ploskev zanemarljiv. Kamninska osnova na ploskvi je apnenec, tla na ploskvi in v okolici prekrivajo podobni tipi tal kot ploskev v Rajhenavskem Rogu (folični histozoli, litični, eutrični in rendzični leptozoli, eutrični kambizol in haplični luvizol), le da imajo primerljivi tipi tal v vrzeli gospodarskega gozda na Snežni jami nekoliko tanjšo organsko plast in večji delež hitro razkrajajočih se oblik humusa (Urbančič in sod., 2004). Sestojno vrzel, vključeno v študijo, predstavlja golosek, izsekan v letu 2000, ki po velikosti ustreza vrzeli v Rajhenavskem Rogu. V vrzeli v začetku vzorčenja še ni bilo naravne regeneracije lesnih vrst, so pa ozeleneli nekateri panji bukve, obilna je bila vegetacija enoletnic in trav.

REZULTATI IN PREGLED DOSEGANJA ZASTAVELJNIH CILJEV

Ključni rezultat projekta je poenotena oziroma za analize gozdnih tal prilagojena metodologija identifikacije, kvantifikacije in statistične obdelave rezultatov za posamezne študirane skupine organizmov. Za posamezno skupino v nadaljevanju podajamo metodologijo, ko smo jo validirali in uporabili na dveh testnih ploskvah:

1. Ektomikoriza (i.) vzorčenje tal in shranjevanje; ii.) čiščenje vzorcev zemlje in ločevanje in določevanje tipov ektomikorize; iii.) anatomska identifikacija; iii.) identifikacija tipov ektomikorize s primerjavo molekularnih markerjev; iii/a.) analiza DNK z restriksijsko analizo (PCR-RFLP); iii/b.) sekvenciranje DNK; v.) shranjevanje referenčnega materiala in vi.) shranjevanje DNK;
2. Identifikacija gliv – dekompozitorjev celuloze: i.) Priprava materiala za dekompozicijo; ii.) instalacija na ploskvi; iii.) časovno zaporedno naključno vzorčenje; iii.) odvzem vzorca za molekularne analize gliv in bakterij (-> sušenje, tehtanje -> analize dinamike dekompozicije);
3. Identifikacija dekompozitorskih bakterij na celulozi
4. Določevanje vrstne pestrosti in pojavljanja izbranih skupin pedofavne in vretenčarjev

1/i.) Vzorčenje tal za analizo tipov ektomikorize in shranjevanje do analize

Vzorče za analizo tipov ektomikorize smo odvezemali s standardizirano sondo z volumnom 274 ml, premerom 4,2 cm do globine ca 18 cm (standardizirani vzorci) (Kraigher, 1999). Vzorce smo odvezemali enkrat letno ob koncu rastne sezone (začetek novembra). Kot možnost zaporednega jemanja predlagamo jemanje vzorcev preko celega leta, v kolikor so nadaljnje analize časovno izvedljive. Vzorce zemlje za analizo tipov ektomikorize smo odvezemali v transektu preko vrzeli, tako da smo prva in zadnja dva vzorca odvzeli v sklenjenem sestoju

Vzorče zemlje za analizo tipov ektomikorize in koreninskega sistema smo že na terenu shranili v PVC vreče in jih takoj po končanem transportu shranili na temperaturi 2-4°C. Vzorce smo do čiščenja shranjevali v hladilniku do največ enega meseca. V tem času ni prišlo do izgube integritete vzorca.

1/ii.) Čiščenje vzorcev zemlje in ločevanje in določevanje tipov ektomikorize
Vzorci zemlje za nadaljnje analize smo vsaj 12 ur pred analizo namočili v vodo, za lažje odstranjevanje delcev substrata. V očiščenem vzorcu smo analizirali vse korenine in kratke korenine ter pod stereolupo pregledali tudi ostale rastlinske ostanke v vzorcu (razkrajajoče korenine, listje in veje). Pri ločevanju pod lupo smo si pomagali s pinceto, skalpelom in tankim čopičem.

Morfološke tipe smo med seboj ločevali po makroskopskih, mikroskopskih in biokemijskih lastnostih. Pri delu smo uporabljali stereo lupo (Olympus, SZX12, vir svetlobe Olympus Highlight 3100, filter za dnevno svetlobo) in mikroskop (Olympus, BX51, povečava 100-2000x). Izbrane tipe ektomikorize in anatomske preparate smo digitalizirali z digitalno kamero DP12-Olympus .

1/iii.) Anatomska identifikacija

Tipe ektomikorize smo določevali po anatomskih in morfoloških lastnostih glede na objavljene opise (Agerer, 1987-2002; Agerer s sod., 2001; Brand, 1991; Ingleby s sod., 1990) ali kratke opise (Comandini in sod., 2001; Eberhardt in sod., 2000) po metodologiji, opisani v Kraigher (1996).

1/iiii.) Identifikacija tipov ektomikorize s primerjavo molekularnih markerjev

Izbrane tipe ektomikorize, identificirane po anatomsko-morfološki metodi ter neidentificirane tipe ektomikorize smo uporabili v PCR-RFLP analizi. Pri identifikaciji z molekularnimi metodami smo pridobivali molekularne markerje iz genomske DNK in identificirali vzorce ektomikorize s primerjavo pridobljenih molekularnih markerjev. Molekularne analize smo izvajali na več nivojih (PCR produkt, RFLP vzorec ali zaporedje nukleotidov (sekvence). Markerji so lahko sami po sebi rezultat (npr. prisotnost nekega organizma v preiskovanem vzorcu), oziroma jih lahko primerjamo z referenčnimi bazami podatkov z namenom določitve organizma, izključitve, iskanja podobnosti, filogenetskih študij in podobno. Pri delu smo se omejili na dele ribosomalnih genov v genomski DNA in dveh medgenskih regijah, ki jih obdajata (18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNK, ITS2 in 28S rDNK).

Prva koraka, nujna za analizo molekularnih markerjev sta ekstrakcija DNK iz izhodnega materiala in pomnoževanje izbrane regije v genomu.

DNK smo ekstrahirali iz mikorizne koreninice, ki smo jo predhodno pod lupo čim bolj očistili delcev zemlje in organskega materiala ali 5-15 mg himenija trosnjaka (referenčni material, identificiran herbarijski material). Ekstrakcijo DNK smo za vse vzorce izvedli po protokolu za ekstrakcijo genomske DNK z 2% CTAB (Doyle in Doyle 1990). Za ekstrakcijo nekaterih vzorcev smo uporabili tudi predpripravljene postopke za ekstrakcijo iz rastlinskega ali glivnega materiala (Plant DNeasy Kit (Promega), Fungal DNA extraction kit (E.Z.N.A.)).

S polimerazno verižno reakcijo smo pomnoževali ITS1, ITS2 in 5,8S rDNK regije v genomu višjih gliv. Za pomnoževanje smo uporabili pare začetnih oligonukleotidov ITS1f in ITS4b ali ITS1f in ITS4 (White in sod. 1990; Gardes in Bruns 1993) in ekstrahirano DNK v končnih razredčitvah 50 do 1000 krat. Reakcije pomnoževanja smo izvedli kot je opisano v Kraigher in sod., 1995 in Grebenc in sod., 2000.

1/iiii/a.) Analiza DNK z restrikcijsko analizo (PCR-RFLP)

Za cepljenje namnožene DNK smo uporabili 10 µl PCR produkta (oziroma do 20 % več, če je bil PCR produkt na gelu slabše opazen), po navodilih proizvajalca endonukleaz. Za

restriksijske analize smo uporabili smo tri endonukleaze HinfI, MboI in TaqI, kot priporoča Kårén (Kårén in sod., 1997), ki smo jih uporabili že v predhodnih študijah (Grebenc in Kraigher, 2000; Grebenc in sod., 2000). Restrikcije smo ločevali na 2% agarozni, DNK barvali z etidijevim bromidom, vizualizirali pod UV lučjo (302 nm) in gele digitalizirali z GelDoc sistemom (BioRad).

Analizo in interpretacijo RFLP vzorcev smo izvedli s programskim paketom Taxotron (Grimond, 1998) in organizirali v PCR-RFLP bazo podatkov, ki je dostopna na domači strani GIS

http://www.gozdis.si/departments/fisiologygenetics/forfisiology_genetics_dept.htm

(Grebenc et al., 2000). Baza je razdeljena na dve skupini, prva vsebuje referenčne RFLP vzorce in neznane vzorce za bazidiomicete, drugi del vsebuje referenčni material in neznane vzorce za askomicete. Vzoredno smo pripravili tudi manjšo PCR-RFLP bazo podatkov za določanje lesnih rastlin, ki se so se potencialno pojavljale na raziskovalnih ploskvah, v primeru, da mikroskopsko (na osnovi lastnosti korenin) nismo uspeli v predhodnih analizah identificirati rastlinskega partnerja.

1/iiii/b. Sekvenciranje DNK

Za izbrane vzorce tipov ektomikorize, ki jih nismo uspeli določiti po anatomsko-morfološki metodi in s PCR-RFLP analizo, smo sekvencirali pomnožene ITS regije v genomski rDNK. Pred sekvenciranjem smo DNK, pomnoženo v PCR ločevali na 2% agaroznem gelu, izrezali pomnožene fragmente in jih očistili z Wizard SV Gel and PCR Clean - Up sistemom (Promega). Obe verigi DNK smo sekvencirali v ločenih reakcijah z začetnimi oligonukleotidi ITS1f, ITS4b ali ITS4 (White in sod. 1990; Gardes in Bruns 1993). DNK smo sekvencirali v laboratoriju za molekularno genetiko Dr. Marie P. Martín v Botaničnem vrtu v Madridu (Real Jardin Botanico, Madrid, Španija), pri komercialno dostopnem servisu za sekvenciranje (Sequiseve) ali na GIS (AB, AbiPrism 310).

Dobljene elektroferograme po sekvenciranju in avtomatsko generirane sekvence smo ročno analizirali s programom Sequence Navigator Software ali Sequencher, s katerim smo naredili tudi konsenzusno zaporedje sekvenc. Tako dobljena zaporedja smo primerjali in kolikor mogoče določili s podatki v GenBank bazi in bazi UNITE in jih v omenjenih bazah podatkov tudi deponirali.

1/v.) Shranjevanje referenčnega materiala

Vse trosnjake, ki smo jih uporabili v molekularnih analizah kot referenčni material ter vzorce tipov ektomikorize, ki smo jih analizirali, smo shranili v Herbariju in mikoteki Gozdarskega inštituta Slovenije. Trosnjake smo shranjevali posušene na zraku (40°C, v temi), izbrane vzorce tipov ektomikorize pa bodisi kot poltrajne mikroskopske preparate plašča, rizomorfov in drugih struktur fiksiranih v mlečni kislini na objektnem steklu ali kot trajne preparate dehidrirane v alkoholni vrsti in shranjene v mešanici FAA (formaldehid – etanol 96% – ledocetna kislina v razmerju 5:90:5).

1/vi.). Shranjevanje DNK

Vse ekstrakte DNK, ki so uspešno pomnoževali v vsaj eni od reakcij smo shranili v bazo DNK ekstraktov, ki jo hranimo v priročnem zamrzovalniku na -80°C

2. Identifikacija gliv – dekompozitorjev celuloze

2/i.) Priprava materiala za dekompozicijo

V analizi dekompozitorskih gliv in bakterij smo se, kot substrat za kolonizacijo, odločili uporabiti čisto nebeljeno celulozo, saj smo le s tem lahko zagotovili uniformnost substrata na vseh ploskvah in hkrati minimalizirali vnos organizmov, ki bi se lahko pojavljali na substratu že prej (npr. z listjem, vejicami, koreninami,...odvzeti iz narave). Substrata nismo sterilizirali. Vrečke za dekompozicijo smo naredili iz inertnega plastične mrežice (mreža za komarnik), z velikostjo por ca 1mm x 1mm. Velikost vrečke je okoli 11cm x 11cm tako, da smo lahko vanjo namestili celulozni list velikosti 10,5cm x 7cm s skupno površino okoli 73,5cm². Ves izhodni material (celuloza, vrečke) smo ves čas shranjevali na čistem mestu in z njim delali s čistini rokavicami.

2/ii.) Inštalacija vrečk za dekompozicijo na ploskvah

Na ploskvah v Rajhenavskem Rogi in Snežni jamo smo v vrzeli, mladju in v sklenjenem sestoju inštalirali vrečke v skupinah, tako da smo zajeli kar se da homogene talne razmere na mikrolokaciji. Vrečke v posamezni skupini so bile med sabo oddaljene najmanj 10cm. Vrečke smo vstavljali vertikalno, tako da je spodnji rob substrata (celuloza) segal do globine ca 10cm. Po inštalaciji smo zemljo rahlo pritisnili v prvotni položaj in tako zagotovili tesnejši stik z vstavljenim substratom.

2/iii.) Časovno zaporedno vzorčenje

Vrečke s substratom za dekompozicijo smo odvezemali s ploskve postopno in sicer tako, da smo vzorčili po 3 vrečke na vzorčenje. Vrečke smo iz skupine na posamezni mikrolokaciji vzorčili naključno., enkrat na mesec, razen v zimskem času od novembra do aprila, ko smo pričakovali minimalno biološko aktivnost). Vzorčili smo dokler se substrat (celuloza) ni popolnoma razkrojil oziroma največ 2 leti.

2/iiii.) Odvzem vzorca za molekularne analize gliv in bakterij

Vrečke smo iz zemlje pobirali posamično tako, da smo čim manj poškodovali substrat v vrečki. Vsako vrečko (vzorec) posebej smo shranili v PVC vrečki, da smo preprečili izsuševanje in v času vzorčenja ter v laboratoriju do nadaljnje uporabe shranjevali na 4°C. Že na terenu smo odstranili večje kose zemlje, dodatno smo vsako vrečko očistiti še v laboratoriju s pinceto in čopičem.

Vzorke celuloze za analize dekompozitorskih bakterij in gliv smo jemali tako, da smo s plutovrtom odvezemali po 3 izvrtke z vsakega celuloznega lističa, v kolikor je bilo to mogoče na različnih višinah (zgoraj, sredina, spodaj) celuloznega lističa in jih združili v en reprezentativen vzorec za posamezen celulozni listič. Vzorce smo nedvoumno označili in do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C. Celoten čas med vzorčenjem na terenu in shranjevanjem izvrtkov v zamrzovalniku smo kolikor je bilo mogoče skrajšali in s tem minimalizirali možnosti razvoja mikroorganizmov, ki se sicer v pogojih gozdnih tal niso imeli možnosti razvijati to zaznavnih koncentracij. Pestrost populacij višjih gliv na celulozi smo analizirali z metodo DGGE, kjer smo kot začetna nukleotida uporabili s CG-sponko označen začetni oligonukleotid ITS1f (Gardes and Bruns, 1993; modificirano) in ITS 2 ali 4 (White et al. 1990). Pomnožene fragmente smo ločevali na na 20-60% gradientnem gelu, barveli z barvilom SybrGreen in analizirali z izbranim statističnim programom.

3. Identifikacija dekompozitorskih bakterij na celulozi

Za identifikacijo bakterij, ki se pojavljajo na razkrajajoči celulozi so prve stopnje

(priprava, izpostavljanje, vzorčenje, hranjenje in ekstrakcija DNK; t.j. 2/i – 2/iiii) identične kot za analizo gliv. Bistvena razlika je v uporabi pristopa ugotavljanja pestrosti in identifikacije, kjer kot metodo izbora predlagamo T-RFLP analizo (predvsem zaradi uporabe manj specifičnih začetnih oligonukleotidov in mnogokrat večje pestrosti na vrstnem in višjih taksonomskih nivojih. Za analizo bakterijskih združb smo uporabili začetna oligonukleotida 27f [5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' označenega s 6-FAM (6-carboxyfluorescein) na 5' koncu] in 927r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'). PCR smo pripravili pri standardnih pogojih za reakcijo ter pomnožene fragmente rezali z endonukleazo HaeIII, reakcijo mešali s standardom (ROX) in ločevali s kapilarno elektroforezo (ABI PRISM 3100 DNA sequencer). Dobljene T-RFLP profile smo analizirali s programom Genescan (ABI) in predstavljajo osnovo za T-RFLP bazo podatkov (neposredna primerjava pestrosti). Dodatno lahko pomnožene fragmente kloniramo v ustrezen vektor, sekvenciramo in identificiramo z uporabo klasičnih in znanih postopkov.

4. Določevanje vrstne pestrosti in pojavljanja izbranih skupin pedofavne

4/i.) Talni vzorci: Uporabili smo kvantitativno metodo vzorčenja tal, metodo kvadratov. Vzorčili smo z vzorčevalnim svedrom s premerom 21 cm in višino 33 cm. Vzorčne enote smo jemali z vzorčevalnim svedrom tako, da smo sveder zavrtali čim globlje (do 15 cm) v tla. Vzorčna enota je tako zajela tudi listni opad (do 2 cm) in fermentacijski horizont. Na vsaki raziskovalni ploskvi smo določili kvadrat 15x15 metrov in znotraj tega odvzeli 9 vzorčnih enot približno enakomerno razporejenih po kvadratu. Izvrtane in označene vzorce tal smo shranili v plastične vrečke. Še isti dan smo vzorce tal odnesli v laboratorij, kjer smo jih sušili na Tullgrenovih lijakah modificiranih tako, da je bil spodnji del lijaka hlajen. Vzorce tal smo položili na sita premera 25 cm in višino 10 cm tako, da je bil listni opad spodaj. Sita smo postavili na plastične lije, nad katerimi so bile 40 W žarnice. Sušenje vzorcev je trajalo 21-30 dni.

4/ii.) Identifikacija: Iz posodic, ki so bile postavljene pod lijaki, v katere so padale živali iz talnih vzorcev in iz posodic z ulovom iz talnih pasti, smo ločili strige in jih določili do vrst.

4/iii.) Statistična obdelava rezultatov: 4/iii/a.) Obdelava podatkov o ulovu strig pri vzorčenju tal Za metodo kvadratov, ocenitev števila vrst in podobnostne koeficiente je uporabljen računalniški program Programs for Ecological Methodology, 2nd edition (Krebs 2000). Z metodo smo ocenili gostoto populacije za vsako vrsto ter tudi za nedoločene in mladostne osebkke na vsaki lokaciji za vsako vzorčenje posebej. Zaradi majhnosti in malega števila vzorčnih enot zaradi omejenih možnosti sušenja vzorcev so meje zaupanja izračunanih srednjih vrednosti relativno široke. 4/iii/b.) Značilnosti združb (predlagane metode statističnih obdelav. Jackknife ocena za metodo kvadratov je metoda za ocenitev vrstnega bogastva (števila vrst v združbi), kadar je za vzorčenje združbe uporabljena metoda kvadratov (Krebs 1989). Ocena temelji na opaženi frekvenci redkih vrst v združbi. Preštete so vrste, ki se pojavljajo le v eni vzorčni enoti (enkratne vrste). To so prostorsko redke in ne nujno številčno redke vrste, saj so lahko osebkki močno grupirani. S Shannon–Wienerjevim indeksom smo ocenili vrstno diverziteteto: $H' = -\sum (p_i) \log_2 p_i$, kjer je H' = indeks vrstne diverzitetete, s = število vrst, p_i = delež vorca, ki pripada vrsti i ; Stalnost (Evenness) V literaturi najpogosteje uporabljen indeks stalnosti oziroma dominantne porazdelitve je osnovan na Shannon-Wienerjevi funkciji: $J' = H' / H'_{MAX}$, kjer je J' = merilo stalnosti (med 0 in 1), H' = indeks vrstne diverzitetete, H'_{MAX} = maksimalna vrednost $H' = \log_2 S$. Dominanca: v zoocenologiji pokažemo dominanco z relativno številčnostjo vrste ali težo glede na površinsko ali prostorninsko enoto (vzorec). Indeks, ki

kaže to dominanco, imenujemo indeks individualne dominanc: $DN = \frac{a}{S} \cdot 100$ (%). a = število osebkov vrste A v vzorcih združbe S = vsota osebkov vseh vrst, ki jih vsebujejo vzorci združbe. Dominanco lahko prikazujemo samo v okviru iste taksonomske skupine ali velikostnega razreda in prehranjevalnega tipa (Tarman 1992).

5. Možnosti analize pestrosti gozdne favne vretenčarjev, na primeru redkih in ogroženih vrst gozdnih kur

Večje živali (vretenčarji) so tako prehransko, kot bivanjsko, tesno vezani na gozdna tla, zato smo se, ob pripravljenosti sodelavca odločili, da v projekt naknadno vključimo tudi manjši prispevek s področja vretenčarjev. Biotsko pestrost gozdnih ekosistemov smo proučevali na primeru redkih in ogroženih vrst kot so gozdne kure (divji petelin, ruševca, gozdni jereb). Gostota teh vrst v zadnjih desetletjih po vsej Evropi vztrajno upada, pri nas so zavarovane z Uredbo o zavarovanju redkih in ogroženih živalskih vrst iz leta 1993 (Ur.l. 1993/57). Zaradi specifičnosti njihovih habitatov in občutljivosti na spremembe v gozdnih ekosistemih jih raziskovalci priznavamo kot indikatorje spreminjanja biotske pestrosti gozdov. Na tej osnovi smo gozdne kure tudi določili za kvalifikacijske vrste za izločanje evropsko pomembnih območij ohranjenosti narave Natura 2000. V gorskem gozdnem prostoru Slovenije, kjer so prisotne stabilne populacije, so bile med ključnimi vrstami za obsežna razglašena območja.

Popis prostorske razporeditve in gostote teh vrst gozdnih kur je prilagojen skritemu življenju in sporadični prisotnosti ter specifičnemu obnašanju subpopulacij oz. parov ob parjenju ali pa popisu drugih znakov prisotnosti (sledí). Popis opravljajo gozdarji ali lovci, specialisti (petelinarji).

Gozdnega jereba (*Bonasa bonasia*) popisujemo na klic v jeseni ali po sledih na mestih, kjer se prepelijo v pesku ali prahu (Mikuletič 1984, Mohorič in Čas 2005):

Ruševca (*Tetrao tetrix*) in divjega petelina (*Tetrao urogallus* L.) popisujemo po številu in spolu odraslih osebkov ob zgodnje jutranjem petju na rastiščih, kjer se zgodaj spomladi rastiijo, ruševca v začetku maja (Gulič in sod. 2003), divjega petelina konec aprila in maja (Adamič 1987, Čas 1999, 2006).

Z postavitvijo metodologije za posamezne omenjene skupine ter validacijo na terenu smo kot rezultate le teh izpolnili večino zastavljenih ciljev projekta:

- dopolnjevali smo že obstoječe baze PCR-RFLP baze podatkov za ektomikorizne in saprofitske glive (askomicete in bazidiomicete) ter na novo postavili bazo T-RFLP vzorcev za bakterije
- zbrani podatki o biotski raznovrstnosti (tudi popisi) in sukcesiji dekompozitorskih gliv v naravnem in gospodarskem gozdu na izbranih substratih smo dopolnili molekularne baze podatkov za ugotovljene vrste in baze podatkov za pojavljanje makromicet v Sloveniji (*Boletus Informaticus*, GIS)
- opravili smo prvo analizo bakterijskih združb v naravnih gozdnih ekosistemih za področje Slovenije. Delno statistično obdelani podatki kažejo na izjemo (a pričakovano) veliko pestrost bakterij že znotraj ponovitev na posamezni od analiziranih ploskev, tako da statistično potrjene in značilne primerjave (pod)ploskev z različnimi režimi gospodarjenja (pragozdni reervat, gospodarski gozd, mladje, golosek) nismo uspeli izvesti.
- dopolnitve javno dostopnih zbirk nukleotidnih zaporedij (GenBank) z nukleotidnimi zaporedji pridobljenimi v okviru predlaganega projekta, tkao smo v času trajanja prokejta v bazo posredovali okoli 250 novih vnosov, pretežno višjih gliv iz skupine Ascomycotina in Basidiomycotina
- zasnovali smo bazo podatkov pojavljanja strig, ki predstavlja nadaljevanje

doktorskega dela ene od sodelavk na projektu. Primerjava literaturnih podatkov pojavljanja strig za primerljiva rastišča gospodarskih gozdov z bukvi in pragozdnega rezervata ni pokazala značilnih razlik v vrstni pestrosti ali številu na enoto površine, kar kaže na relativno naravnost bukovih gozdov v Dinaridih hkrati pa tudi to, da so strige relativno mobilne in s tem lahko zajamejo precej večji (in manj specifičen) teritorij, kot sesilne skupine organizmov

- del baz podatkov je že javno dostopnih (PCR-RFLP baza (http://www.gozdis.si/departments/fisiologygenetics/forfisiology_genetics_dept.htm), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Boletus Informaticus (http://www.gozdis.si/departments/forestprotection/events/20041019/bi_m.htm)), medtem ko podatke za pedofavno in bakterije še zbiramo in ugotavljamo možnosti pridružitve morebitnim obstoječim zbirkam

- postavili smo metodologijo s podrobnim opisom pristopov, ki jih uporabljamo za analizo gozdnjih tal, primernih za razmere v centralno evropskih gozdovih. V prihodnje predvidevamo možnosti uporabe metodologije (v celoti ali izbrane metode) v več državah na območju EU, v okviru analiz indikatorskih ploskev (program Forest Focus in BioSoil), ter predvidenih prijavah projektov na nacionalni ravni.

- Pripravili smo preliminarne izračune in ocene biotske raznovrstnosti za posamezne skupine organizmov in celokupne raznovrstnosti na izbranih raziskovalnih ploskvah Rajhenavski Rog (pragozd, referenčna ploskev) in Snežna jama (primerljiv gospodarski gozd). Podrobnejše rezultate smo delno že prikazali, v pripravi pa imamo tudi več publikacij, v katerih bomo predstavili podrobnejše rezultate.

- Del vsebin projekta CRP smo vključili v prijavo projekta v 7.OP RTD EU program, z naslovom » Biodiversity assessment in target forest ecosystems around Mediterranean Basin with relation to History and Management«. Žal je bil predlog ob prvi prijavi zavrnjen, z možnostjo dodelave in ponovne prijave.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

- Dopolnitve in revizija obstoječih baz podatkov v gozdarstvu (na primer PCR-RFLP baze podatkov za ektomikorizne in saprofitske glive - askomicete in bazidiomicete) ter na novo postavitev baze T-RFLP vzorcev za bakterije, ki omogočajo zanesljivejšo identifikacijo gliv v vseh RR postopkih, kjer je to potrebno.
- Podatki o biotski raznovrstnosti in sukcesiji ektomikorize, dekompozitorskih gliv v naravnem in gospodarskem gozdu ter pojavljanja specifični organizmov na izbranih substratih nam omogočajo boljše poznavanje procesov dekompozicije in s tem posredno dinamike posameznih rezervoarjev ogljika v gozdnjih tleh, z možnostjo njihove vključitve v modele ali validacijo le teh na osnovi dobljenih kvalitetnih podatkov
- Neposredna uporaba dobljenih podatkov in preračunov pestrosti v indikacijske namene, predvsem v mislu ugotavljanja ohranjenosti analiziranih gozdnih ekosistemov.
- Postavitev in podroben opis metodologije in pristopov, ki jih uporabljamo za analizo gozdnjih tal, primernih za razmere v centralno evropskih gozdovih.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Boljše poznavanje biotske raznovrstnosti gozdnjih tal, ki lahko vodi do večje zavesti o pomenu gozdnih tal ne le kot pomembnega rezervoarja ogljika ampak tudi kot vira številnih organizmov z velikim potencialom uporabe v biotehnoške namene (velika funkcionalna in genetska pestrost)

Predlagana metodologija lahko predstavlja izziv za nadaljnje izpopolnjevanje metod in boljše ocenjevanje izbranih parametrov pestrosti.

Vključevanje metodologije in rezultatov v prihodnje raziskovalne dejavnosti, predvsem pa razširitev na druge gozdne ekosisteme z možnostjo validacije primernosti v različnih tipih gozda in klimatskih regijah.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Raziskovalci - sodelavci, ki se ukvarjajo z drugimi aspekti gozdnih tal, ter na mednarodnem nivoju skupine, ki vidijo možnosti uporabe rezultatov za validacijo (klimatskih) modelov oziroma predvidevanj sprememb. Predvsem del nalog, vezanih na identifikacijo in taksonomijo posameznih skupin organizmov pa pritegne tudi raziskovalce, ki vidijo v nastajajočih bazah podatkov pomemben in dolgoročen vir informacij in možnosti uporabe referenčnega materiala ali podatkov za primerjave z lastnimi raziskavami.

3.7. Število diplomantov, magistrrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

| |
|--|
| |
|--|

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

| |
|--|
| COST akcija E38, E52 (sodelovanje in znanstveni prispevki); Univerza v Antverpnu (sodelovanje pri modeliranju procesov v gozdnih tleh in skupne publikacije) |
|--|

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

| |
|--|
| Javne predstavitve raziskovalnih in metodoloških dognanj pridobljenih v projektu, več skupnih publikacij in utrditev dosedanjega sodelovanja, vključno s skupno prijavo projekta na razpis 7.EU OP |
|--|

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

| |
|--|
| |
|--|

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije. Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

