

GDK 181.351 + 174.7 *Picea abies* (L. Karsten) __ 016.7

Prispelo / Received: 11. 7. 1997

Sprejeto / Accepted: 10. 10. 1997

Izvirni znanstveni članek

Original scientific paper

INOKULACIJA SMREKE (*PICEA ABIES* /L./ KARSTEN) Z MIKORIZNIMI GLIVAMI: VPLIV NA RAST IN RAZVOJ V DREVESNICI IN PO PRESADITVI

Dominik VODNIK*, Nađa GOGALA**

Izvleček

Prispevek opisuje inokulacijske poskuse z ektomikoriznimi glivami v Sloveniji. Prikazani so učinki treh gliv, *Laccaria laccata*, *Lactarius piperatus* in *Pisolithus tinctorius*, na rast sejank v drevesnici in presajenk na s težkimi kovinami onesnaženem rastišču v Žerjavu. Podana je primerjava rastnih parametrov, vsebnosti fotosintetskih pigmentov in vsebnosti fosforja, kalcija in kalija v inokuliranih sejankah in presajenkah eno leto po presaditvi. Vse tri glive stimulirajo rast sejank v drevesnici, pri čemer so opazni učinki simbioze na mineralno prehrano ter asimilacijo smreke. Po presaditvi je uspevanje sadik, inokuliranih z glivo *Laccaria laccata*, slabše kot uspevanje drugih sadik. Vsebnosti P in klorofilov ter karotenoidov so pri presajenkah nižje kot pri sejankah, vsebnosti K in Ca pa višje.

Ključne besede: mikoriza, inokulacija, smreka, rast, fiziologija

INOCULATION OF NORWAY SPRUCE (*PICEA ABIES* /L./ KARSTEN) WITH MYCORRHIZAL FUNGI: THE IMPACT ON GROWTH AND DEVELOPMENT IN A TREE NURSERY AND AFTER TRANSPLANTATION

Abstract

Inoculation experiments with ectomycorrhizal fungi in Slovenia are described in the article. The effects of *Laccaria laccata*, *Lactarius piperatus* and *Pisolithus tinctorius* on the growth of spruce seedlings in the nursery and outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings onto heavy metal polluted area in Žerjav a year thereafter are shown. Growth parameters and contents of photosynthetic pigments and contents of phosphorus, calcium and potassium for the seedlings in the nursery and in Žerjav are compared. All three fungi stimulated the growth of spruce seedlings in the tree nursery. The effects of symbiosis on the growth, mineral nutrition and assimilation are noticeable. Outplanting performance of *L. laccata* inoculated seedlings is worse than in other seedlings. The contents of P, chlorophylls and carotenoids are lower in the transplanted seedlings than in the nursery. The opposite is true for the Ca and K.

Key words: mycorrhiza, inoculation, spruce, growth, physiology

* Asist., dipl. biol., Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 1111 Ljubljana, Večna pot 111, SLO

** Prof. dr., dipl. biol., Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 1111 Ljubljana, Večna pot 111, SLO

KAZALO / CONTENTS

1	UVOD / INTRODUCTION	89
2	MATERIAL IN METODE / MATERIAL AND METHODS	92
2.1	VZGOJA MIKORIZNIH SADIK V DREVESNICI / <i>CULTIVATION OF MYCORRHIZAL SEEDLINGS IN A TREE NURSERY</i>	92
2.2	PRESADITEV NA STALNO RASTIŠČE / <i>TRANSPLANTATION TO A PERMANENT PLOT</i>	93
2.3	MERITVE RASTNIH PARAMETROV / <i>MEASUREMENTS OF GROWTH PARAMETERS</i>	93
2.4	MERITVE FOTOSINTETSKIH PIGMENTOV / <i>MEASUREMENTS OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS</i>	94
2.5	MERITVE VSEBNOSTI MINERALOV / <i>MINERAL CONTENT MEASUREMENTS</i>	94
2.6	STATISTIČNA ANALIZA / <i>STATISTICAL ANALYSIS</i>	94
3	REZULTATI / RESULTS	94
4	RAZPRAVA / DISCUSSION	101
5	SUMMARY	104
6	VIRI / REFERENCES	107
7	ZAHVALA / ACKNOWLEDGEMENTS	108

1 UVOD

Mikoriza se je v evoluciji razvila kot rezultat vzajemnega prilagajanja višjih rastlin in gliv na različne naravne stresne dejavnike. V mutualističnem odnosu glive, ki kolonizira koreninski sistem in gostiteljske rastline, slednja preskrbuje mikobionta z ogljikovimi hidrati, proizvedenimi v primarni produkciji. Prisotnost glivnega partnerja vpliva na intenzivnejši sprejem hranilnih snovi iz tal. Povečana razrast koreninskega sistema in micelij, ki se širi od korenin v tla, omogočata povečanje areala, v katerem lahko mikorizna rastlina izkorišča minerale. Mikoriza vpliva na vitalnost rastlin in zavira staranje ter zaščiti rastline pred patogeni. V naravnih razmerah je mikoriza funkcijsko povezana z mikroorganizmi v rizosferi, kar ustvarja dinamično združbo, prilagojeno na stresne situacije, ki jih ustvarjajo biotski in abiotski dejavniki v okolju (BOWEN 1978).

Klasifikacija mikorize temelji na tem ali hife penetrirajo rastlinsko celično steno (endomikoriza) ali ne (ektomikoriza). Nadaljna razdelitev temelji na različnih kombinacijah rastlinskih in glivnih taksonomskih skupin. Zaradi uporabe v biotehnologiji po vsem svetu raziskujejo endomikorizne in ektomikorizne glive, njihovo biotsko raznovrstnost in fiziologijo. Saditev mikoriziranih sadik z izbranimi glivnimi vrstami oziroma sevi pospeši obnovo po gozdnih požarih in področij, ki so bila izpostavljena talnemu oziroma zračnemu onesnaževanju ali pretiranemu pridelovanju na kmetijskih površinah. Na takšnih rastiščih je samonikla populacija talnih mikroorganizmov zaradi antropogenega vpliva navadno prizadeta, biodiverziteta mikoriznih gliv, ki so za normalno funkcijo gozda bistvenega ekološkega pomena, pa zmanjšana. Zaradi tega dejstva je spontano vzpostavljanje simbioze omejeno in v tem primeru je uporaba inokuliranih mikoriznih sadik za sajenje tudi najbolj učinkovita. Vsak tip onesnaženosti zahteva temeljite raziskave mikoriznih gliv, ki bodo zaradi tolerance ali rezistence na polutanta lahko zaščitile rastline pred virom onesnaženja. Tem raziskavam pa sledi izbira biotehnoloških metod za vzgojo rezistentnih mikoriznih rastlin, ki bodo uspevale v določenem ekološko obremenjenem okolju.

Uporaba definiranega inokuluma z glivo, ki je bila fiziološko in ekološko najprimernejša za uporabo na določenem gozdnem rastišču, je bila prvič izvedena v Avstriji (MOSER 1958), v Argentini (TAKACS 1961) in Avstraliji

(THEODORU / BOWEN 1970). Danes je najuspešnejši program inokulacije gozdnih drevesnih vrst s češko gomoljiko *Pisolithus tinctorius* zaradi njene geografske razširjenosti in velikega spektra vrst, s katerimi je v simbiozi, ter zaradi odpornosti na različne stresne razmere kot so suša, visoke temperature in onesnaženje (MARX 1985).

Prvi in najpomembnejši korak inokulacijskega programa je selekcija oziroma izbira primerne glive, za kar se upošteva več kriterijev (HARVEY et al. 1994):

- fiziološke in ekološke razlike med vrstami ektomikoriznih gliv, na primer tvorba obsežne mikorize na največjem možnem številu gostiteljev,
- fiziološke in ekološke razlike med posameznimi sevi izbrane glivne vrste iz različnih gozdnih sestojev in fitogeografskih regij,
- sposobnost hitre rasti v čisti kulturi, sposobnost preživetja med skladiščenjem do vnosa v tla,
- ekološka prilagodljivost izbrane glive na okolje, kamor naj bi bile sadike posajene, na primer ekstremne razmere podnebja in tal, antagonizem z drugimi talnimi organizmi, uporaba pesticidov, sprememba tipa tal ob presaditvi, pH tal, itd.,
- konkurenčnost v primerjavi z drugimi glivami, prisotnimi na presaditvenem področju.

Selekciji sledi priprava inokuluma. Upoštevati moramo razpoložljivo opremo, vrstno specifično rast glive, možnost razpolaganja z velikim številom spor, itd. Tako so v posameznih državah razvile naslednje tehnologije priprave inokuluma (MARX / CORDELL 1989):

- Uporaba prsti ali humusa iz naravnih lokacij posamezne drevesne vrste. Ta način ima veliko slabih strani, kot so prisotnost nezaželenih vrst gliv ali patogenih mikroorganizmov in semena različnih plevelov. Metoda zadovoljuje le tiste, ki trdijo, da je kakršnakoli mikoriza boljša od nobene.
- Uporaba spor različnih vrst gliv je zelo primerna, ker ni potrebna vzgoja micelija v sterilnih pogojih in ker jih lahko hranimo več kot eno leto. Težko pa je določiti viabilnost spor, ker navadno kalijo le ob prisotnosti simbionta. Obstaja tudi velika genetska variabilnost med sporami. Ker je za vzpostavitev

mikorize s takšnim inokulumom potreben daljši čas, lahko druge vrste vzpostavijo mikorizo pred izbrano vrsto.

- Vegetativni inokulum (micelij) se pretežno uporablja v raziskovalne namene in za vzgojo sadik v rastlinjaki in kontejnerjih. Za večje površine v drevesnicah je problem pridobivanje zadostne količine micelija, zraslega v posebnih vrečah na substratu z dodanimi hranilnimi elementi.
- Fragmentiran, submerzno vzgojen vegetativni inokulum lahko vgradimo v Na-alginat. Poznana je tudi proizvodnja hidrogelnih kroglic, ki vsebujejo micelij. Oboje omogoča enostavnejšo inokulacijo in uporabo tudi v večjem obsegu.

Pri prenosu mikorizne biotehnologije v gozdarsko prakso prednjačijo ZDA, Kanada in Francija. V ZDA tako že nekaj časa poteka komercialna proizvodnja inokuluma (MARX / CORDELL 1989).

Do leta 1996 je bilo na področju biotehnološke uporabe mikorize objavljenih 126 znanstvenih del, ki so obravnavala 669 različnih kombinacij mikoriznih simbiotov. V poskuse je bilo zajetih 72 vrst gostiteljskih rastlin in 81 glivnih vrst. Pri 299 kombinacijah so ugotovili pozitiven vpliv simbioze na rast sadik, v 49 primerih je bil učinek negativen, v sedmih primerih so opazili tako pozitivne, kot tudi negativne vplive na rast, v 314 primerih pa niso opazili nobenih razlik med rastjo inokuliranih sadik in kontrolo. Največ drevesnih vrst z ektomikorizo, vključenih v dosedanje poskuse, spada v družino *Pinaceae* (*Pinus* spp. 34, *Picea* spp. 4, *Abies* spp. 3, *Pseudotsuga* spp. 1, *Tsuga* spp.1). Inokulacijske poskuse pa so na njih izvajali z uporabo 73 vrst ektomikoriznih gliv. Kar v 42 % poskusov je bila uporabljena gliva *Pisolithus tinctorius*. (CASTELLANO 1996). Značilno je, da so se pozitivni učinki inokulacije pokazali predvsem v stresnih pogojih, ko so bile drevesne sadike posajene na onesnažena rastišča, rastišča ekstremna zaradi neugodnega temperaturnega in vodnega režima, pa tudi v primerih, ko je šlo za zasajanje izven arealov naravne razširjenosti določene drevesne vrste (CASTELLANO 1996).

Pri uporabi inokuliranih sadik nas seveda najbolj zanima rastni odgovor po presaditvi na rastišče. Prej pa je nujno potrebno dobro poznavanje učinkov

inokulacije iz laboratorijskih poskusov (npr. študije kompatibilnosti) in spremljanje rasti in fiziološkega stanja sadik po inokulaciji v drevesnici.

V Sloveniji so se prvi inokulacijski poskusi pričeli leta 1988 po predhodnih bazičnih raziskavah na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo, Univerze v Ljubljani. Z vegetativnim inokulumom treh gliv: rdečkaste bledivke (*Laccaria laccata*), popraste mlečnice (*Lactarius piperatus*) in peščenke (*Suillus variegatus*) so bile ob sejanju inokulirane sejanke smreke *Picea abies*. Sejanke so rasle v prosti vzgoji; po dveh letih je bila nabolj pospešena rast pri sejankah, inokuliranih z glivama *Laccaria laccata* in *Lactarius piperatus*, medtem ko je bil vpliv mikorize z glivo *S. variegatus* manjši (GABROVŠEK / GOGALA 1990). V letu 1991 je bila na enak način izvedena inokulacija sejank smreke z glivami *Laccaria laccata*, *Lactarius piperatus* in *Pisolithus tinctorius*.

Prispevek prikazuje primerjavo nekaterih parametrov, ki smo jih izmerili na inokuliranih in neinokuliranih smrekovih sejankah zadnjo sezono rasti v drevesnici in eno leto po presaditvi na stalno rastišče v Žerjavu. Glede na razlike med posameznimi skupinami inokuliranih in neinokuliranih presajenk ovrednoti tudi primernost različnih vrst mikoriznih gliv za nadaljnjo uporabo.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 VZGOJA MIKORIZNIH SADIK V DREVESNICI

Za inokulacijo smo uporabili vegetativni inokulum treh gliv: rdečkaste bledivke - *Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.) Bk. et Br., DB29, češke gomoljike - *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch, DB49 in popraste mlečnice - *Lactarius piperatus* (L. ex Fr.) Gray, DB31 iz glivne banke Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete. Cepiči so bili iz svežih kultur micelija, vzgojenega na trdnem M40 gojišču (STEVENS 1974), precepljeni na steriliziran vermikulitno-šotni substrat, ki mu je bilo dodano tekoče M40 gojišče. Micelij je preraščal v temi pri 25°C in po treh mesecih rasti so vse tri glive popolnoma prerasle substrat. Tako pripravljen inokulum smo v maju 1991 uporabili za inokulacijo smreke *Picea abies* (L.) Karsten, provenienca Brezovec, Pohorje (700 m nadmorske višine) v

drevesnici Omorika, Muta. Glivni inokulum smo sprali s tekočo vodo in ga v koncentraciji cca 2 l/m² vkopali v zgornji sloj osnovnega šotno-vermikulitnega substrata (4:1). Za kontrolo smo pripravili podlago na enak način, le da substrat ni vseboval glivnega micelija. Na tako pripravljeno podlago smo posejali seme smreke. Sejanke so rasle v drevesnici dve rastni sezoni. Pri njihovi vzgoji nismo uporabili nobenih kemičnih sredstev. Pred presaditvijo smo s pregledom koreninskega sistema vzorčnih rastlin ocenili uspešnost inokulacije za vse tri uporabljene glive. Deleži mikoriznih vršičkov so bili podobni pri vseh treh skupinah inokuliranih sejank (ocena ca. 70 %). Mikorizni vršički so bili prisotni tudi pri kontrolnih rastlinah, vendar je bil njihov delež bistveno manjši kot pri inokuliranih. Za posamezne glive se je morfološki izgled mikorize inokuliranih rastlin skladal z opisom tipov ektomikorize v literaturi (AGERER 1987-93).

2.2 PRESADITEV NA STALNO RASTIŠČE

V maju 1993 smo dvoletne sejanke smreke iz drevesnice presadili na rastišče v Žerjavu v Mežiški dolini, ki se nahaja v vplivnem območju talilnice svinca. Poskusna ploskev je bila nad tako imenovano Dolino smrti. Tla so rendzina na apnencu in dolomitu nevtralne reakcije (pH 6-7), delež organske snovi je 23,7 %, KIK > 30, onesnažena so s težkimi kovinami. Vsebnosti svinca, ki je glavni kovinski polutant, znašajo od 98 ppm na globini od 20-30 cm do 9.550 ppm v prvih petih centimetrih tal (VODNIK, neobjavljeni podatki). Poleg prisotnosti kovin je vegetacija izpostavljena tudi drugim stresnim dejavnikom: neugodnemu vodnemu režimu, visokim intenzitetam svetlobe in tudi občasnim ožigom s SO₂. V preteklih letih je Rudnik Mežica s spremembo tehnologije in omejitvami proizvodnje v talilnici deloma omejil emisije prašnih delcev in SO₂. V zadnjem obdobju pa se zopet srečujemo z občasnimi močnejšimi plinskimi ožigi. Prisotne kovine v tleh pa predstavljajo stalen problem.

2.3 MERITVE RASTNIH PARAMETROV

Po presaditvi v Žerjav smo spremljali sezonske prirastke v letih 1995 in 1996 pri posameznih skupinah presajenk. V zadnji sezoni smo s pomičnim merilom merili tudi debelino koreninskega vratu. Vsakokrat smo izmerili 20-40 sadik iz posamezne skupine presajenk.

2.4 MERITVE FOTOSINTETSKIH PIGMENTOV

Za analizo fotosintetskih pigmentov smo septembra vzorčili iglice poganjkov predhodnega letnika. Po ekstrakciji z ohlajenim acetonom smo določali vsebnost klorofila *a* (Chl *a*) in klorofila *b* (Chl *b*) ter karotenoidov (LICHTENTHALER 1987). Za vsako skupino sadik je bilo analiziranih 6-10 vzorcev iz 6-10 rastlin.

2.5 MERITVE VSEBNOSTI MINERALOV

Za analizo fosforja, kalcija in kalija smo septembra vzorčili iglice poganjkov predhodnega letnika ter korenine. Rastlinski material smo posušili pri 120°C do konstantne mase in 0,2 g suhega vzorca razklopili s konc. HNO₃ in HClO₄. Vzorci smo razredčili z bidestilirano vodo na 50 ml. Kalij in kalcij smo določili s plamensko fotometrijo, fosfor pa spektrofotometrično z rumeno metodo (HODNIK 1988). Število analiziranih vzorcev je bilo enako kot pri analizi pigmentov.

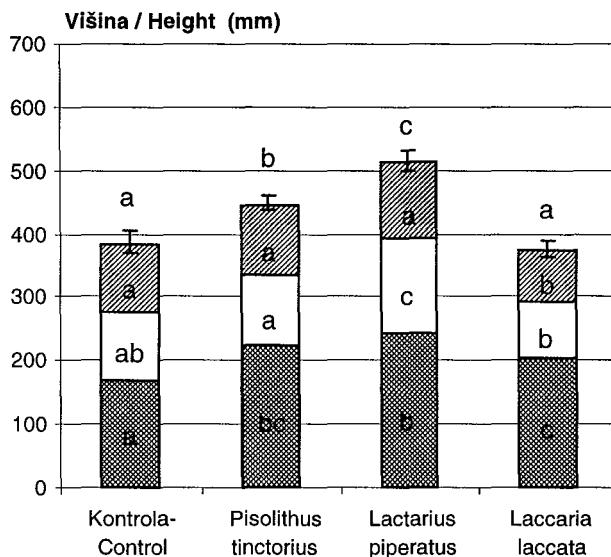
2.6 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo podatkov smo uporabili analizo variance in posamezne skupine sadik primerjali z LSD testom. Obdelavo podatkov smo opravili s programskim paketom Statistica (StatSoft). V grafikonih in preglednicah je označeno število vzorcev (*n*) in stopnja tveganja (*p*).

3 REZULTATI

Rezultati meritev rastnih parametrov v drevesnici so pokazali stimulativen učinek na rast pri vseh treh proučevanih mikoriznih glivah. Rast je bila najbolj pospešena pri sejankah, inokuliranih z glivama *L. laccata* in *P. tinctorius* (podatki niso prikazani). Spremljanje istih parametrov po presaditvi v Žerjav nam pokaže slabše priraščanje presajenk, inokuliranih z glivo *L. laccata* v primerjavi z ostalimi skupinami presajenk (grafikon 1). Ostali dve skupini inokuliranih presajenk ohranjata prednost v rasti v primerjavi s kontrolnimi - neinokuliranimi, kljub izenačenemu prirastku v zadnji sezoni. Omeniti je potrebno še signifikantno večji prirastek presajenk, inokuliranih z glivo *L. piperatus*, v primerjavi z drugimi, v

sezoni 1995. Podobno stanje nam pokaže tudi debelina koreninskega vratu, merjena ob koncu sezone 1996 (preglednica 1).



Grafikon 1: Rast smrekovih sadik, inokuliranih s tremi različnimi ektomikoriznimi glivami, po presaditvi v Žerjav - višina in letni prirastki ■ = višina 1994, □ = prirastek 1995, ▨ = prirastek 1996. Vrednosti za posamezno časovno obdobje, označene z isto črko, statistično niso različne, ANOVA, $p < 0,05$, $n = 20-40$. (Sanacija termoelektrarnih objektov, 1997; z dovoljenjem urednika).

Graph 1: The growth of spruce seedlings inoculated with three different ectomycorrhizal fungi after transplantation in Žerjav - height and annual gain in height. ■ = height in 1994, □ = gain in height in 1995, ▨ = gain in height in 1996. Values followed by the same letter within one period do not differ, ANOVA, $p < 0,05$, $n = 20-40$. (Sanation of the thermo-power plants, 1997; with permission of the editor).

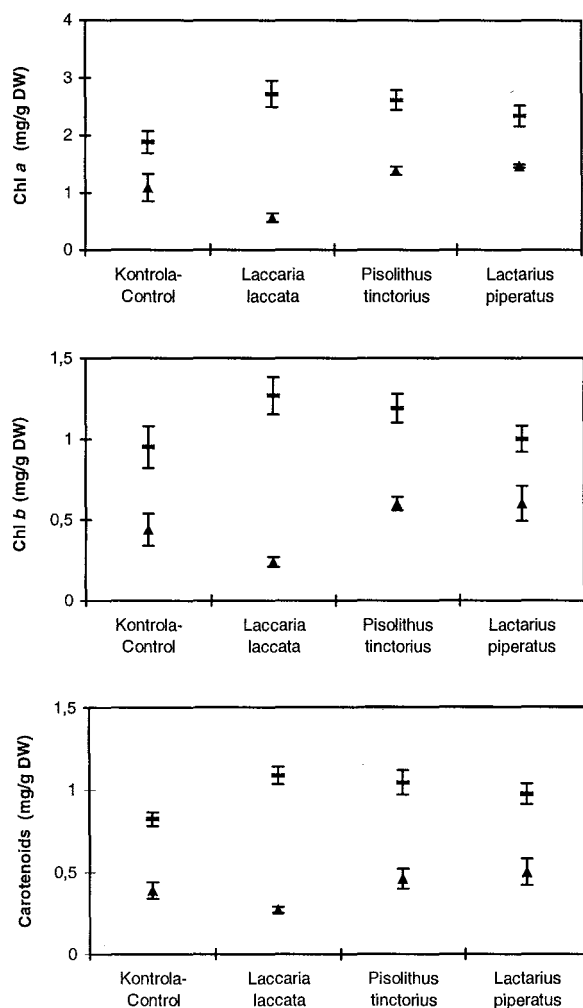
Preglednica 1: Rast smrekovih presajenk, inokuliranih s tremi različnimi ektomikoriznimi glivami po presaditvi v Žerjav - debelina koreninskega vratu v letu 1996. Vrednosti, označene z isto črko, statistično niso različne, ANOVA, $p < 0,05$, $n = 20-40$.

Table 1: *The growth of spruce seedlings inoculated with three different ectomycorrhizal fungi after transplantation in Žerjav - stem collar diameter in 1996. Values followed by the same letter do not differ, ANOVA, $p < 0,05$, $n = 20-40$.*

	Debelina koren.vratu (mm) Stem collar diameter (mm)		
Kontrola / Control	8,3	± 0.4	a
Pisolithus	10,0	± 0.4	b
Lactarius piperatus	10,7	± 0.4	b
Laccaria laccata	8,4	± 0.4	a

Meritve fotosintetskih pigmentov v iglicah sejank v drevesnici pokažejo statistično značilne višje vsebnosti Chl *a* ter karotenoidov pri vseh treh skupinah inokuliranih sejank v primerjavi s kontrolnimi-neinokuliranimi sejankami. Najvišje vsebnosti fotosintetskih pigmentov so bile izmerjene v iglicah sejank, inokuliranih z glivo *L. laccata*, kjer je bila signifikantno višja tudi vsebnost Chl *b* v primerjavi s kontrolo. Razmerje med klorofiloma *a* in *b* je bilo najnižje pri kontrolnih sejankah (1,9 : 1), najvišje pri sejankah, inokuliranih z glivo *L. piperatus* (2,5 : 1), pri ostalih dveh skupinah inokuliranih sejank pa je bilo enako (2,2 : 1) (slika 2).

Eno leto po presaditvi v Žerjav so bile izmerjene bistveno nižje vsebnosti fotosintetskih pigmentov v primerjavi s stanjem v drevesnici. Vsebnost Chl *a*, Chl *b* in karotenoidov v iglicah presajenk inokuliranih z glivo *L. laccata* je bistveno manjša kot pri ostalih inokuliranih in neinokuliranih presajenkah, razlika je statistično značilna. Signifikantnih razlik med presajenkami, inokuliranimi z ostalima dvema glivama in kontrolnimi presajenkami, ni (grafikon 2).

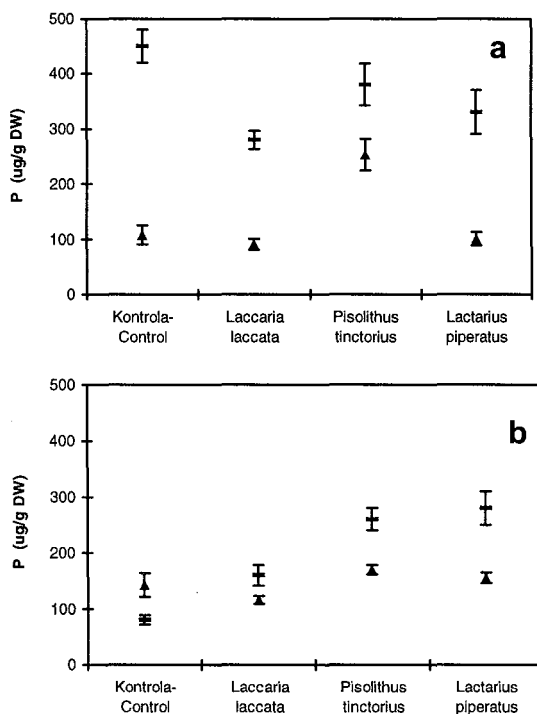


Grafikon 2: Fotosintetski pigmenti v iglicah smreke, inokulirane z različnimi ektomikoriznimi glivami. – = sejance v drevesnici (september 1992), ▲ = presajenke v Žerjavu, eno leto po presaditvi (september 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

Graph 2: Photosynthetic pigments in the needles of Norway spruce inoculated with different ectomycorrhizal fungi. – = seedlings in the tree nursery (September 1992), ▲ = seedlings in Žerjav one year after transplantation (September 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

Razmerje Chl *a* / Chl *b* je za posamezne skupine presajenk naslednje: kontrola = 2,47 : 1, *L. laccata* = 2,33 : 1, *P. tinctorius* = 2,33 : 1, *L. piperatus* 2,45 : 1

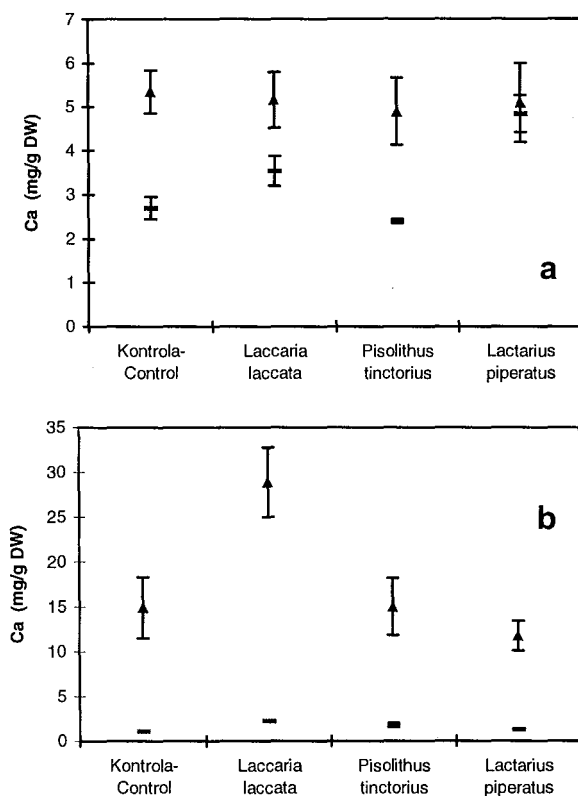
Vsebnost fosforja v iglicah (grafikon 3a) je pri kontrolnih sejankah najvišja. Iste rastline imajo signifikantno manj fosforja v koreninah (grafikon 3b). Najvišja skupna vsebnost fosforja je pri sejankah, inokuliranih z glivama *P. tinctorius* in *L. piperatus*. Leto dni po presaditvi na rastišče v Žerjavu so koncentracije P v iglicah in koreninah vseh presajenk nižje v primerjavi s stanjem v drevesnici. Izstopajo presajenke, inokulirane s *P. tinctorius*, kjer je koncentracija P v iglicah nekajkrat višja kot pri ostalih presajenkah (grafikon 3a). Bolj izenačene so koncentracije P v koreninah, nekaj manj P je v koreninah presajenk, inokuliranih z glivo *L. laccata*, največ pa spet v koreninah presajenk, inokuliranih z glivo *P. tinctorius*.



Grafikon 3: Vsebnost fosforja v iglicah (a) in koreninah (b) smreke, inokulirane z različnimi ektomikoriznimi glivami. — = sejanke v drevesnici (september 1992), ▲ = presajenke v Žerjavu, eno leto po presaditvi (september 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

Graph 3: Phosphorus content in the needles (a) and roots (b) of Norway spruce inoculated with different ectomycorrhizal fungi. — = seedlings in the tree nursery (September 1992), ▲ = seedlings in Žerjav one year after transplantation (September 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

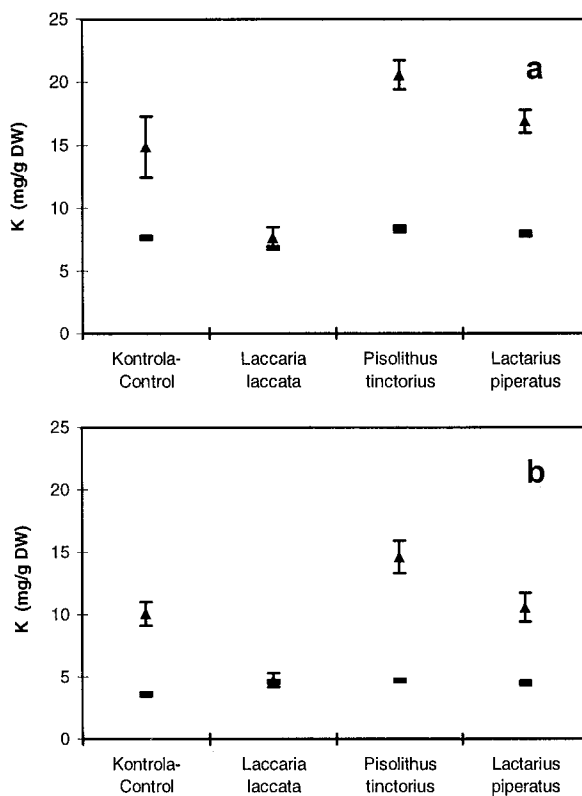
Vsebnosti kalcija v iglicah in koreninah presajenk so bistveno višje kot vsebnosti istega elementa v enoletnih sejankah v drevesnici. Glede na Ca v iglicah so razlike med posameznimi skupinami sejank večje, največ kalcija ga je v iglicah smreke, inokulirane z glivo *L. piperatus*. Po presaditvi so največje razlike v vsebnosti Ca v koreninah. Izstopajo presajenke, inokulirane z glivo *L. laccata*, kjer je vsebnost Ca v koreninah bistveno višja kot pri vseh treh ostalih presajenkah (grafikon 4).



Grafikon 4: Vsebnost kalcija v iglicah (a) in koreninah (b) smreke, inokulirane z različnimi ektomikoriznimi glivami. — = sejanke v drevesnici (september 1992), ▲ = presajenke v Žerjavu, eno leto po presaditvi (september 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

Graph 4: Calcium content in the needles (a) and roots (b) of Norway spruce inoculated with different ectomycorrhizal fungi. — = seedlings in the tree nursery (September 1992), ▲ = seedlings in Žerjav one year after transplantation (September 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

Vsebnost kalija v iglicah in koreninah sejank je zelo podobna, med posameznimi skupinami sadik ni nobenih značilnih razlik. Eno leto po presaditvi so vsebnosti K v iglicah in koreninah višje, kot so bile v drevesnici, razen pri presajenkah, inokuliranih z glivo *L. laccata*. Najvišje vsebnosti K so bile izmerjene v iglicah in koreninah presajenk, inokuliranih z glivo *P. tinctorius*.



Grafikon 5: Vsebnost kalija v iglicah (a) in koreninah (b) smreke, inokulirane z različnimi ektomikoriznimi glivami. – = sejanke v drevesnici (september 1992), ▲ = presajenke v Žerjavu, eno leto po presaditvi (september 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

Graph 5: Potassium content in the needles (a) and roots (b) of Norway spruce inoculated with different ectomycorrhizal fungi. – = seedlings in the tree nursery (September 1992), ▲ = seedlings in Žerjav one year after transplantation (September 1994). ANOVA, $p < 0,05$, $n = 6-10$.

4 RAZPRAVA

Inokulacijski poskusi z različnimi kombinacijami gostiteljske rastline in mikorizne glive so pokazali, da se stimulativen učinek simbioze ne izrazi vedno (CASTELLANO 1996). Pri izbiri primerne glive za inokulacijo določene drevesne vrste, je zaradi tega potrebno poleg osnovne kompatibilnosti partnerjev v simbiozi proučiti zgodnje učinke inokulacije na rast in razvoj drevesnih sejank v drevesnici in tudi nadalje spremljati rastni odgovor inokuliranih presajenk po presaditvi na rastišče.

Različni sevi gliv *Laccaria laccata*, *Lactarius* sp. in *Pisolithus tinctorius* so bili v kombinaciji z različnimi gostiteljskimi vrstami uporabljeni v več inokulacijskih poskusih v drevesnicah. Z rdečkasto bledivko so bili doseženi dobri rezultati pri mikorizaciji duglazije, smreke in rdečega bora (MARX et al. 1991, LE TACON et al. 1992). Uporaba mlečnic (*Lactarius*) za inokulacijo je bila manjša in omejena na inokulacijo bora in hrasta (CASTELLANO 1996). Češka gomoljika je največkrat uporabljena gliva v inokulacijskih programih. S posebno selekcijo so v ZDA dosegli njeno izredno visoko infektivnost. Uporablja se predvsem za inokulacijo bora. Mikorizirane sadike so zaradi odpornosti na stresne pogoje zelo primerne za zasajanje ekstremnih rastišč (MARX et al. 1991).

V drevesnicah s prosto vzgojo je v Evropi naravno prisotna gliva *Telephora terrestris*, s katero tvorijo različne drevesne vrste mikorizo spontano. Tako v večini inokulacijskih poskusov kontrolne rastline niso nemikorizne, ampak mikorizne s to glivo (LE TACON et al. 1992). V našem poskusu je bila mikorizna infekcija prisotna tudi pri kontrolnih - neinokuliranih sejankah. Zaradi pojavljanja trosnjakov glive *T. terrestris* v drevesnici in morfoloških značilnosti njene mikorize sklepamo, da prihaja v drevesnici do infekcije smrekovih sejank z omenjeno glivo.

Rastni parametri ter meritve vsebnosti fotosintetskih pigmentov in vsebnosti P, K in Ca v iglicah in koreninah sejank nam pokažejo stimulativen učinek vseh treh mikoriznih gliv na rast in razvoj smrekovih sejank v drevesnici v primerjavi s kontrolnimi - neinokuliranimi sejankami. Že v prejšnjih poskusih se je rdečkasta bledivka *L. laccata* pokazala kot najprimernejši simbiot za inokulacijo smreke (GABROVŠEK / GOGALA 1990). V tem poskusu sta bili za inokulacijo uporabljeni še glivi *Suillus variegatus* in *Lactarius piperatus*. Tudi v našem poskusu je glede na vse merjene parametre rdečkasta bledivka delovala na rast

in razvoj smrekovih sejank najbolj stimulatивно, čeprav razlike glede na drugi dve glivi, predvsem češko gomoljiko *P. tinctorius*, niso bile bistveno večje. Opaženi pozitivni učinki so verjetno posledica znanih fizioloških dogajanj v mikorizi, predvsem izboljšane preskrbe z minerali in stimulacije fotosintetske produkcije. Na sejankah, ki smo jih uporabili v poskusu, smo izmerili tudi fotosintetsko aktivnost, ki je bila pri inokuliranih sejankah višja kot pri kontroli (VODNIK / GOGALA 1994).

Ob presaditvi smo mikorizno infekcijo ocenili kot zadovoljivo. Za vsako natančnejše ovrednotenje uspešnosti inokulacije pa bi bila potrebna kvantifikacija mikoriznih vršičkov in točen izračun deleža mikoriznih korenin na koreninskem sistemu.

Končni učinek inokulacije se izrazi šele po daljšem obdobju po presaditvi mikoriznih rastlin na rastišče. Rastni odgovor je specifičen glede na vrsto ali sev mikobionta in se lahko razlikuje od rastnega odgovora sejank ob inokulaciji v drevesnici. Enega od bistvenih dejavnikov za rast presajenk pa predstavljajo tudi pogoji na rastišču, predvsem tla. Tako lahko ob uporabi različnih kombinacij drevesne vrste in glive po presaditvi na različna rastišča dobimo zelo variabilne rezultate rasti (CASTELLANO 1996, LE TACON et al. 1992).

Da bi ovrednotili učinke inokulacije na rast sadik smreke po presaditvi na rastišče v Žerjavu, smo nadaljevali meritve istih parametrov, kot smo jih merili v drevesnici. Meritve rasti ter analize klorofilov, karotenoidov in nekaterih mineralov kažejo na slabše uspevanje presajenk, inokuliranih z glivo *L. laccata*, v primerjavi z ostalimi presajenkami. Vzrokov za to je lahko več. Pomemben dejavnik je lahko manjša toleranca te glive na svinec v primerjavi z ostalimi glivami, ki je poznana iz naših laboratorijskih poskusov *in vitro* (VODNIK, neobjavljeni podatki). Gliva lahko v nekaterih primerih z vezavo kovine omeji njen transport v poganjek in s tem zmanjša toksičnost, pri tem pa je zelo pomembno, da je sposobna tvoriti obsežen izvenkoreninski micelij, ki je ključen pri tej absorpcijski funkciji. Tako je lahko slabša rast micelija glive *L. laccata* v onesnaženih tleh vzrok za slabše uspevanje presajenk. Možno je, da je prav fitotoksičnost svinca odločujoč stresni faktor, saj je bila v iglicah presajenk, inokuliranih z glivo *L. laccata*, ob koncu druge rastne sezone po presaditvi izmerjena 3-4 krat višja vsebnost Pb kot pri vseh ostalih treh skupinah presajenk (podatki niso prikazani). Zaradi kompleksnega stresnega okolja, pa je seveda tudi možno, da je boljše uspevanje presajenk, inokuliranih z glivo *P. tinctorius* in *L. piperatus* pogojeno z drugimi učinki mikorizne asociacije, predvsem z izboljšano preskrbo z vodo in hranili. Tako je bila v presajenkah,

inokuliranih z glivo *P. tinctorius*, izmerjena večja vsebnost kalija v koreninah in fosforja v poganjkih, v primerjavi z ostalimi skupinami smrekovih presajenk. Izostanek teh učinkov simbioze pri glivi *L. laccata* pa je lahko spet povezan z njeno večjo občutljivostjo na visoke koncentracije Pb v tleh.

Koncentracije fosforja v iglicah in koreninah presajenk v Žerjavu so precej nižje, kot so bile pri sejankah v drevesnici. Za rendzino na apnencu in dolomitu je ob plitvem profilu in neugodnem vodnem režimu značilna majhna razpoložljivost P (ĆIRIĆ 1989), kar je lahko vzrok za slabšo preskrbljenost s fosforjem, ki je glede na znane podatke za smreko (SIMONČIČ 1997), nezadostna. Funkcija mikorize je lahko v tem primeru bistvena, saj ne gre samo za izboljšanje prehranjenosti s fosforjem. S povečanim privzemom P so povezane tudi interakcije fosfata s kovinskimi ioni, kar lahko omeji fitotoksičnost težkih kovin. Večji privzem fosforja je najbolj očiten pri sadikah, inokuliranih z glivo *P. tinctorius*. Preskrbljenost sadik s kalcijem in kalijem je dobra. Visoke vsebnosti Ca v koreninah presajenk, inokuliranih z glivo *L. laccata*, zaslužijo pozornost v nadaljnjih raziskavah.

Po presaditvi se tudi pri neinokuliranih rastlinah mikoriza razvije spontano, s kolonizacijo samoniklih gliv, prisotnih na rastišču. S tem se lahko razloži dejstvo, da se v več parametrih presajenke smreke inokulirane z glivama *P. tinctorius* in *Lactarius piperatus* ne razlikujejo od kontrolnih - neinokuliranih presajenk. Samonikle glive lahko kolonizirajo koreninski sistem že inokuliranih rastlin v procesu sukcesije. To je naraven pojav, vendar je pomembno, da so glive, uporabljene za mikorizacijo, toliko kompetitivne, da do njihovega nadomeščanja z drugimi ne pride prehitro. Tako se lahko po presaditvi ohrani prednost v rasti, pridobljena v drevesnici in lažje premosti presaditveni šok, kar je odločilnega pomena za rast in razvoj rastlin na ekstremnem rastišču. Na takšen učinek mikorizacije pa po treh sezonah rasti v Žerjavu kažejo tudi parametri, izmerjeni za presajenke inokulirane z glivama *P. tinctorius* in *L. piperatus*. Za študije preživetja za inokulacijo uporabljenih gliv ter za proučevanje sukcesije mikoriznih tipov na rastišču, pa bi bilo potrebno za posamezne skupine sadik identificirati prisotnost posameznih mikoriznih tipov.

Za natančnejšo opredelitev učinkov inokulacije na rast in razvoj smreke bo potrebno rast presajenk spremljati še nekaj naslednjih sezon. Nekateri pozitivni učinki mikorize, ki so se izrazili v drevesnici in ohranili tudi po presaditvi, nakazujejo, da je možno s primerno selekcijo kombinacije gostiteljsko drevo - mikorizna gliva izboljšati uspevanje presajenk po presaditvi na ekstremna

rastišča. To je še posebej odločilno na rastiščih, kjer smo z antropogenim vplivom osiromašili tudi populacije samoniklih gliv, saj je v tem primeru zmanjšana tudi biotska raznovrstnost mikoriznih tipov ali pa je spontana tvorba mikorize pri neinokuliranih rastlinah zaradi odsotnosti gliv sploh onemogočena. Glede na velikost naše države, ekonomsko stanje in način gospodarjenja z gozdom je potencial biotehnološke aplikacije mikorize v Sloveniji prav v namenski uporabi mikoriziranih sadik za zasajanje izbranih ekstremnih rastišč. Za takšno aplikacijo pa so potrebne obsežne predhodne raziskave.

5 SUMMARY

Mycorrhiza is a term for symbiosis between fungi and plant roots which can be found in ecosystems all over the world, in the majority of higher plants. The evolution of different plant and fungal species is a consequence of their common adaptation to natural stress factors, since mycorrhiza is, evolutionally speaking, adaptation to unfavourable living conditions. The presence of a fungal partner promotes a more intense uptake of nutrients from the soil. Increased growth of their root system and a mycelium spreading from the roots into the soil enable an increase in the accessibility area for minerals. Mycorrhiza has an influence on the vitality of plants, inhibits ageing and protects plants from pathogens. In natural conditions, mycorrhiza is functionally connected with micro-organisms in the rhizosphere, which creates a dynamic community, adapted to stressful situations created by biotic and abiotic factors in the environment (BOWEN 1978).

Mycorrhizal fungi, their biotic variation and their physiology are studied due to their use in biotechnology. The planting of mycorrhized seedlings with selected fungal species or strains accelerates the recovery of sites of fire, areas exposed to soil or air pollution or excessively cultivated agricultural land. Each type of pollution requires thorough research of the mycorrhizal fungi which will be able to protect plants from the source of pollution due to tolerance for or resistance to the pollutant. This research is followed by the selection of biotechnological methods for the cultivation of resistant mycorrhizal plants which will grow well in a certain ecologically conditioned environment.

In the use of inoculated seedlings, we are naturally most interested in the growth response after transplantation onto the site. Good prior knowledge of the effects of inoculation on the basis of laboratory experiments (e.g. compatibility studies)

and the monitoring of the growth and physiological condition of seedlings after their inoculation in nurseries are necessary. Outplanting performance of inoculated seedlings differs with respect to the host species, fungal species or isolate used for the inoculation and is also influenced by growth conditions (CASTELLANO 1996).

The first inoculation experiments in Slovenia began in 1988 in the tree nursery in Muta. Upon their planting, seedlings of the Norway spruce (*Picea abies*) were inoculated with vegetative inoculums of three fungi: *Laccaria laccata*, *Lactarius piperatus* and *Suillus variegatus*. The seedlings were grown in a bare-root nursery and in the first two years of growth, the latter was promoted most in seedlings inoculated with the fungi *Laccaria laccata* and *Lactarius piperatus*, while the effect of mycorrhiza with *Suillus variegatus* was smaller (GABROVŠEK / GOGALA 1990).

In the present experiment, inoculation of spruce seedlings with *Laccaria laccata*, *Lactarius piperatus* and *Pisolithus tinctorius* was performed in the same manner. In order to evaluate the physiological condition of the seedlings, various physiological parameters were monitored after one year of growth in the nursery. An increased rate of photosynthesis and a higher content of photosynthetic pigments were established at the end of growth season in all three groups of inoculated seedlings in comparison with control seedlings (VODNIK / GOGALA 1994). In May 1993, two-year spruce seedlings from the nursery experiment were transferred to a site in Žerjav, the Mežica valley, which is located in an area influenced by a lead foundry. The soil is rendzine on limestone and dolomite with a neutral (6-7) pH, polluted with heavy metals. The content of lead, the main metal pollutant, amounts to from 98 ppm at a depth of 20-30 cm to 9.550 ppm in the first five cm of the soil. In addition to the presence of metals, vegetation is also exposed to other stress factors: unfavourable water conditions, high insulation and periodic gas burns with SO₂.

In order to evaluate the growth response of seedlings after transplantation, growth parameters (height, length gain and the thickness of stem collar) and chlorophyll content, photosynthetic activity and the content of K, Ca and P were monitored. The growth parameters have indicated poorer growth of seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in comparison with other inoculated and control seedlings, even though inoculation with this fungus gave an extremely positive growth response in the nursery, better than that obtained in other fungi. As

regards the monitoring of the height of seedlings at the end of the 1996 growing season, i.e. three years after transplantation, it could be established that in seedlings inoculated with the fungi *P. tinctorius* and *Lactarius piperatus* the advantage in growth was still preserved, in spite of an equal length gain in comparison with the control in the last season. Seedlings inoculated with *Lactarius piperatus* were the most promising ones. A similar situation also occurred as regards the thickness of stem collar as measured at the end of the 1996 season. The other measured parameters also indicated that seedlings inoculated with *Laccaria laccata* were under stress: the content of chlorophyll and carotenoids in the needles was lower than in other groups of seedlings; the potassium content in the roots and needles was also lower, while the intake of calcium into the roots was increased.

The reason for poorer growth of *Laccaria laccata* inoculated seedlings in Žerjav could be lower lead tolerance of *Laccaria laccata* to lead, which is known from our *in vitro* studies. Better growth of seedlings inoculated with *P. tinctorius* and *L. piperatus* can result from the effects of mycorrhizal symbiosis, above all better supply of water and nutrients. In seedlings inoculated with *P. tinctorius*, a higher potassium content was measured in the roots and a higher phosphorus content in the shoots in comparison with other groups of spruce seedlings. The absence of these symbiotic effects in the fungus *Laccaria laccata* may be related to its higher sensitivity to increased lead concentrations in the soil.

After transplantation onto the site, mycorrhiza also develops spontaneously in non-inoculated seedlings, through the colonisation of indigenous fungi present at the site. This explains the observations that in several parameters spruce seedlings inoculated with *P. tinctorius* and *Lactarius piperatus* do not differ from control (non-inoculated) seedlings. Indigenous fungi can colonise the root system of already inoculated plants in the process of succession, which is a natural phenomenon, but it is important that the fungi used for mycorrhization are sufficiently competitive, so that they are not replaced by others too soon. Thus, their advantage in growth which was acquired in the nursery can be preserved and the seedlings can overcome the transplantation shock more easily, which is decisive for the growth and development of plants on extreme sites. After three growth seasons in Žerjav, such effects of mycorrhization are also indicated by parameters measured for seedlings inoculated with *P. tinctorius* and *Lactarius piperatus*.

Growth and development of spruce seedlings in Žerjav will need to be monitored for a few subsequent seasons so that it will be possible to establish the effects of inoculation. Certain positive effects of mycorrhiza which were expressed and also preserved in the spruce indicate that with an appropriately selected host tree-mycorrhizal fungus combination it is possible to improve the growth of seedlings after transplantation onto extreme sites. This is especially important in sites in which anthropogenic influence has reduced the populations of indigenous fungi, since in this case the biodiversity of mycorrhizal types has also been reduced, or a spontaneous formation of mycorrhiza in a non-inoculated seedling is even impossible due to the absence of indigenous fungi in the soil.

6 VIRI

- AGERER, R., 1987-93. Colour atlas of ectomycorrhizae.- Einhorn-Verlag.
- BOWEN, G. D., 1978. Dysfunction and shortfalls in symbiotic responses.- In: Horsfall JG, Cowling EB (eds.) Plant diseases, Academic Press, New York, s. 231-256.
- CASTELLANO, M. A., 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings.- In: Mukerji KG (ed.) Concepts in Mycorrhizal Research, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 223-301.
- ĆIRIĆ, M., 1989. Pedologija.- Svjetlost, Sarjevo, 312 s.
- GABROVŠEK, K. / GOGALA, N., 1990. Vpliv nekaterih ektomikoriznih gliv na rast sadik smreke (*Picea abies* /L./ Karsten). - Biološki Vestnik, 38, 3, 47-56.
- HARVEY, L. M. / SMITH, J. E. / KRISTIANSEN, B. / NEILL, J. / SENIOR, E., 1994. The cultivation of ectomycorrhizal fungi.- In: Biotechnology of fungi for improving plant growth, Cambridge University Press, s. 27-39.
- HODNIK, A., 1988. Kemične analize talnih vzorcev, rastlinskih vzorcev in odcednih vod.- Odd.za agronomijo, Univ. v Ljubljani, 65 s.
- LE TACON, F. / ALVAREZ, I. F. / BOUCHARD, D. / HENRION, B. / JACKSON, R. M. / LUFF, S. / PARLADE, J. I. / PERA, J. / STENSTRÖM, E. / VILLENEUVE, N. / WALKER, C., 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe.- In: Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H., Alexander I.J. (eds.): Mycorrhizas in Ecosystems, CAB, Wallingford, s. 119-134.
- LICHTENTHALER, H. K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of Photosynthetic biomembranes. - Methods in Enzymology, 148, s. 350-382.

- MARX, D. H., 1985. Trials and tribulations of an ectomycorrhizal fungus inoculation program.- In: Molina R (ed.) Proceedings of the 6th North American Conference on Mycorrhizae, Corvallis, s. 62-63.
- MARX, D. H. / MAUL, S. B. / CORDELL, C. E., 1991. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry.- In: Leatham, G.F. (ed.) Frontiers in industrial mycology. Chapman & Hall, New York, London, s. 78-98.
- MARX, D. H. / CORDELL, C. E., 1989. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices.- In: Biotechnology of fungi for improving plant growth, Cambridge University Press, s. 1-25.
- MOSER, M., 1958. Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. I. Erfahrungen bei der Reinkultur von Mykorrhizapilzen.- Forstwissenschaftliches Centralblatt, 77, s. 32-40.
- SIMONČIČ, P., 1997. Preskrbljenost gozdnega drevja z mineralnimi hranili na 16 x 16 km mreži.- Zbornik gozdarstva in lesarstva, 52, s. 251-278.
- STEVENS, R. B., 1974. Mycology guidebook.- Univ. Washington Press, Seattle, Washington, s. 668.
- TAKACS, E. A., 1961. Inoculacion de especies de pinos con hongos formadores de micorrizas.- Silvicultura, 15, s. 5-17.
- THEODOROU, C. / BOWEN, G. D., 1970. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi. - Australian Forestry, 34, s. 183-191.
- VODNIK, D. / GOGALA, N., 1994. Seasonal fluctuations of photosynthesis and its pigments in 1-year mycorrhized spruce seedlings.- Mycorrhiza 4, s. 277-281.

7 ZAHVALA

Avtorja se zahvaljujeta mag. Karin Gabrovšek, Mojci Božič dipl. biol. in Jasni Šen za pomoč pri terenskem in laboratorijskem delu. Raziskave je finančno podprlo Ministrstvo za znanost in tehnologijo Republike Slovenije, projekta J1-7391-0487-97 in L-4-6549-0487-94 ter so bile delno izvedene v okviru slovensko-ameriškega projekta, 95-FS-1. Za sodelovanje se zahvaljujeva tudi drevesnici Omorika, Muta, Zavodu za gozdove Slovenije, Območna enota Črna na Koroškem ter Občini Ravne na Koroškem.