

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA



57/2 • 2016

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

Ex: Razprave razreda za naravoslovne vede
Dissertationes classis IV (Historia naturalis)

57/2
2016

SLOVENSKA AKADEMIJA ZNANOSTI IN UMETNOSTI
ACADEMIA SCIENTIARUM ET ARTIUM SLOVENICA
Razred za naravoslovne vede – Classis IV: Historia naturalis

Ob 85-letnici akademika Mitje Zupančiča

LJUBLJANA 2016

Uredniški odbor / *Editorial Board*

Matjaž Gogala, Špela Goričan, Milan Herak (Hrvaška), Ivan Kreft, Ljudevit Ilijanič (Hrvaška),
Mario Pleničar, Livio Poldini (Italija), Dragica Turenšek, Branko Vreš in Mitja Zupančič

Glavni in odgovorni urednik / *Editor*

Ivan Kreft

Tehnični urednik / *Technical Editor*

Janez Kikelj

Oblikovanje / *Design*

Milojka Žalik Huzjan

Prelom / *Layout*

Medija grafično oblikovanje

Sprejeto na seji razreda za naravoslovne vede SAZU dne 21. decembra 2015 in
na seji predsedstva dne 23. februarja 2016.

Naslov Uredništva / *Editorial Office Address*

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

SAZU

Novi trg 3, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Faks / Fax: +386 (0)1 4253 423, E-pošta / E-mail: sazu@sazu.si; www.sazu.si

Avtorji v celoti odgovarjajo za vsebino in jezik prispevkov.

The authors are responsible for the content and for the language of their contributions.

Revija izhaja dvakrat do štirikrat letno / *The Journal is published two to four times annually*

Zamenjava / *Exchange*

Biblioteka SAZU, Novi trg 3, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Faks / Fax: +386 (0)1 4253 462, E-pošta / E-mail: sazu-biblioteka@zrc-sazu.si

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA (Ex *Razprave IV. razreda SAZU*) je vključena v / *is included into*: Index to Scientific & Technical Proceedings (ISTP, Philadelphia) / Index to Social Sciences & Humanities Proceedings (ISSHP, Philadelphia) / *GeoRef Serials* / BIOSIS Zoological Record / *Internationale Bibliographie des Zeitschriften (IBZ)* / *Redakcion Homo* / *Colorado State University Libraries* / *CABI (Wallingford, Oxfordshire)*.

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA (Ex *Razprave IV. razreda SAZU*) izhaja s finančno pomočjo / *is published with the financial support* Javne agencije za raziskovalno dejavnost RS / *Slovenian Research Agency*.

© 2016, Slovenska akademija znanosti in umetnosti

Vse pravice pridržane. Noben del te izdaje ne sme biti reproduciran, shranjen ali prepisan v kateri koli obliki oz. na kateri koli način, bodisi elektronsko, mehansko, s fotokopiranjem, snemanjem ali kako drugače, brez predhodnega pisnega dovoljenja lastnikov avtorskih pravic. / *All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher.*

Naslovnica: *Geranium lucidum* - cvet in listi. Foto: A. Trnkoczy.

Cover photo: Geranium lucidum – flower and leaves. Photo: A. Trnkoczy.

Fotografija na strani 6: Akademik dr. Mitja Zupančič, fotografiral Igor Dakskobler na Zatrniku 20. maja 2015.

Photo on page 6: Academician Dr. Mitja Zupančič in Zatrnik, photo by Igor Dakskobler on May 20, 2015.

VSEBINA CONTENTS

Ivan Kreft

- 5 Ob 85-letnici akademika Mitje Zupančiča, dolgoletnega urednika (1996-2016) Razprav IV. razreda SAZU, oziroma FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA
- 5 Academician Mitja Zupančič, 85-years jubilee of former Editor-in-Chief of FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

RAZPRAVE / ESSAYS

Mitja Zupančič

- 7 A new silver fir association on the Ljubljansko barje (*Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova)
- 7 Nova jelova združba na Ljubljanskem barju (*Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova)

Amadej Trnkoczy & Igor Dakskobler

- 19 Blesteča krvomočnica (*Geranium lucidum* L.), novost v flori slovenskega dela Julijskih Alp
- 19 *Geranium lucidum* L., a novelty in the flora of Slovenian part of the Julian Alps

Domen Finžgar, Marko Bajc, Jernej Brezovar, Andraž Kladnik, Rok Capuder In Hojka Kraigher

- 35 Razvoj patentiranega brezpilotnega sistema za vzorčenje iz drevesnih krošenj
- 35 Development of a patented unmanned aerial vehicle based system for tree canopy sampling

Tanveer Bilal Pirzadah, Bisma Malik, Inayatullah Tahir & Reiaz ul Rehman

- 41 Vivipary in *Fagopyrum esculentum*
- 41 Živorodnost pri ajdi (*Fagopyrum esculentum*)

Paula Pongrac, Peter Kump, Bojan Budič, Katarina Vogel-Mikuš

- 45 Magnesium and phosphorus distributions in developing Tartary buckwheat cotyledons
- 45 Razporeditev magnezija in fosforja v razvijajočih se kličnih listih tatarske ajde

Vida Škrabanja

- 57 Selen v rastlinah in v okolju v Sloveniji
- 57 Selenium compounds in plants and in biosphere in Slovenia

Ines Štraus, Marko Kreft & Hojka Kraigher

- 65 Uporaba dvo-fotonskega konfokalnega mikroskopa za raziskovanje encimske aktivnosti ektomikoriznih gliv in analiza slik s programom ImageJ
- 65 Use of two-confocal microscopy for research of enzymatic activity of ectomycorrhizal fungi and image analysis with ImageJ program

OB 85-LETNICI AKADEMIKA MITJE ZUPANČIČA,
DOLGOLETNEGA UREDNIKA (1996-2016) RAZPRAV IV.
RAZREDA SAZU, OZIROMA FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

ACADEMICIAN MITJA ZUPANČIČ, 85-YEARS JUBILEE OF
FORMER EDITOR-IN-CHIEF OF FOLIA BIOLOGICA ET
GEOLOGICA

Mitja Zupančič, rojen 25. decembra 1931 v Ljubljani, dr. gozdarskih znanosti, znanstveni svetnik v pokoju (Biološki inštitut Jovana Hadžija ZRC SAZU, Ljubljana). Diplomiral je leta 1962 na študiju gozdarstva na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Strokovno se je izpopolnjeval na Dunaju (Hochschule für Bodenkultur, Avstrija) na Univerzi v Poznanju (Poljska) in 1977 doktoriral na gozdarski fakulteti Univerze v Sarajevu.

V letih 1972–1995 je bil vodja geobotanične skupine Biološkega inštituta in vegetacijskega kartiranja Slovenije. V letih 1982 do 1992 je bil vršilec dolžnosti in direktor ZRC SAZU. V letih 1984–1989 je bil glavni urednik in 1986–1989 tudi predsednik programskega sveta Vegetacijske karte Jugoslavije. Njegovo znanstveno delo je usmerjeno v geobotanična – fitocenološka in fitogeografska raziskovanja Slovenije, Balkanskega polotoka in srednje Evrope. Pri fitocenoloških raziskavah je predvsem usmerjen v problematiko gozdne vegetacije. Na podlagi lastnih raziskav ugotavlja nove ali pojavljanje drugih evropskih gozdnih fitocenoz različnih sinsistematskih rangov v Sloveniji in širšem vzhodno-alpsko-dinarskem prostoru. Pri njegovem raziskovalnem delu zavzemajo posebno mesto raziskave smrekovih in borovih fitocenoz. Preučuje teoretične vidike izredno heterogene problematike sinsistematskega in nomenklatoričnega značaja, dinamiko in razvojne poti ter sinekološke razmere fitocenoz. S primerjalnimi študijami opravlja kritične revizije smrekovih in nekaterih drugih fitocenoz v slovenskem in osrednjem balkanskem prostoru. Na osnovi pojavljanja in razširjenosti fitocenoz in flore proučuje fitogeografske probleme in tovrstno delitev Slovenije.

Druga smer njegovega preučevanja je problematika vegetacijskega kartiranja in izvedba vegetacijskih kart. Gre za teoretična vprašanja površinskega prikazovanja fitocenoz in aplikacijo vegetacijskih kart za

Mitja Zupančič, born in Ljubljana, December 25, 1931, PhD in Forestry Sciences, retired scientific research adviser of Institute of Biology Jovan Hadži of Scientific Research Center of SASA, Ljubljana. Editor-in-Chief of *Razprave 4. razr. SAZU* respectively *FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA* in the period 1996–2016. Mitja Zupančič graduated in Forestry at Biotechnical faculty, University of Ljubljana in 1962 and continued his education in Vienna (Austria), Poznan (Poland), in 1977, he received his PhD at the Faculty of Forestry, Sarajevo University. From 1972 to 1995, Zupančič acted as Head of the Group of Geobotany Studies of the Institute of Biology. In the period 1972–1991, he served as Member of the Programme and Scientific Council, Editor in Chief 1984–89, and from 1986 to 1989 President of the Programme Council of the Vegetation Map of Yugoslavia.

His scientific work is mainly devoted to geobotanical, phytocenologic and phytogeographical investigations of Slovenia, the Balkan Peninsula and central Europe. In phytocenology research, he focuses his interest on issues associated with forest vegetation. Based on his own research findings, he notes the emergence of European forest phytocenoses of different synsystematic ranks in Slovenia and at the East-Alpine and Dinaric area. In his research work, Zupančič studies with special attention the fir and pine phytocenoses. He studies the theoretical aspects of the extremely heterogeneous matters of synsystematic and nomenclatory character, the dynamics and developmental paths as well as the synecological circumstances of phytocenoses. With comparative studies, Zupančič critically revises fir and several other phytocenoses in the Slovenian and the central Balkan area. His studies of phytogeographic problems in Slovenia are based on the occurrence and distribution of phytocenoses and flora.

operativne namene gospodarstva, naravovarstvenih problemov, prostorskega načrtovanja ipd. V zvezi s tem delom je soavtor preko 50 elaboratov in okoli 90 vegetacijskih kart v raznih merilih in izvedbah. Posebej omenjamo večletno sodelovanje pri Vegetacijski karti Jugoslavije (1972-1989) ter evropski vegetacijski karti (Karte der natürlichen Vegetation Europas, 2000-2003). Zupančičeva bibliografija obsega prek 300 naslovov v razponu od izvirnih znanstvenih člankov, monografij, knjig do strokovnih poročil. Je član Vzhodnoalpsko-dinarskega društva za preučevanje vegetacije (podpredsednik 1992-2001) in International Association for Vegetation Science. Bil je član redakcijskega odbora Evropske vegetacijske karte (1986-2000), Carta della vegetazione delle Alpi (1992-2000), Znanstvenega sveta Alpen Forum pri Švicarski naravoslovni akademiji (1994-2000). V obdobju 2002 do 2006 je bil tajnik IV. razreda SAZU za naravoslovne vede.

V času njegovega uredništva je bila akademijska revija FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA organizacijsko, oblikovno in vsebinsko prenovljena; kot član uredniškega odbora pa še nadalje sodeluje z recenzijami in nasveti.

Problems associated with vegetation mapping and production of vegetation maps are another research area of Zupančič. It concerns theoretical dilemmas of surface displays of phytocenoses and the application of vegetation maps for operative economic purposes, nature preservation issues, spatial planning, etc. On these topics, Zupančič co-authored over 50 studies and about 90 vegetation maps, of varying scales. His cooperation in the compilation of a multicast Vegetation Map of Yugoslavia (1972-1989) and the European Vegetation Map (Karte der Natürlichen Vegetation Europas, 2000/2003) deserves special mention.

He is a member of the Eastern Alpine - Dinaric Association for Vegetation Studies (vice-president 1992-2001), and member of International Association for Vegetation Science. He was member of editorial board of European Vegetation Map (1986-2000), Carta della vegetazione delle Alpi (1992-2000), and Scientific Board of Alpen Forum at Swiss Academy of Natural Sciences (1994-2000). In the period 2002-2006, he was Secretary of the SASA IV. Section of Natural Sciences.

In the time of his editorship, scientific journal FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA was renovated in regard to organization, layout and scientific content, his continued activity as the member of editorial board is greatly appreciated.

I. Kreft



A NEW SILVER FIR ASSOCIATION ON THE LJUBLJANSKO BARJE (*LAMIO ORVALAE-ABIETETUM* ASS. NOVA)

NOVA JELOVA ZDRUŽBA NA LJUBLJANSKEM BARJU (*LAMIO ORVALAE-ABIETETUM* ASS. NOVA)

Mitja Zupančič¹

Received November 27, 2016; accepted December 31, 2016.
Delo je prispelo 27. novembra 2016, sprejeto 31. decembra 2016.

ABSTRACT

A new silver fir association on the Ljubljansko barje

A new forest association *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova is described on isolated sites on Ljubljansko barje. Their existence is enabled by the ecological conditions, above all the bedrock and soil and the air humidity.

Key words: phytocenology, ecology, Ljubljansko barje, *Lamio-Abietetum*.

IZVLEČEK

Nova jelova združba na Ljubljanskem barju

Opisana je nova gozdna združba *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova. na osamelcih Ljubljanskega barja. Njen obstoj omogočajo ekološke razmere, predvsem geološka podlaga in tla ter vlažna zračna klima.

Ključne besede: fitocenologija, ekologija, Ljubljansko barje, *Lamio-Abietetum*.

¹ SAZU, Novi trg 5, SI-1000 Ljubljana, Slovenija.

1 INTRODUCTION

Some time ago in May 1997, I phytocenologically inventoried an interesting silver fir phytocoenosis in two solitary sites on the Ljubljansko barje (Ig, 335 m; Kot 310 m). They were predominantly covered by silver fir (*Abies alba*) with individual European ash (*Fraxinus excelsior*), pedunculate oak (*Quercus robur*), sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and wych elm (*Ulmus glabra*). These companion trees are characteristic species of fresh to damp soils, which also applies to fir. In addition to the aforementioned tree species, sessile oak (*Quercus petraea*) and Norway spruce (*Picea abies*) are also present. Norway spruce is for the most part secondarily included in fir stands. The presence of sessile oak is normal in the context of the aforementioned tree species; although it prefers dry to moist soils, it is not averse to fresh soils. In view of the quantitative presence of fir, we are of the opinion that it is a fir associa-

tion on fresh carbonate soils and damp atmospheric climate, especially in autumn and partially spring. For now, around twelve fir associations are recognised in Slovenia, of which seven are on acidic and five on carbonate soils. They have been described by eight researchers: Belec, Horvat, Ž. Košir², Marinček, Oberdorfer, Vukelić & Baričević and Wraber (in ŠILC & ČARNI 2012) and TREGUBOV (1962). The most widespread and covering larger areas are the acidophilous fir associations *Bazzanio-Abietetum* M. Wraber 1958, *Galio rotundifolii-Abietetum* M. Wraber 1959 and *Dryopterido affinis-Abietetum* Ž. Košir nom. inval. All other fir associations appear on smaller areas. In view of the aforementioned ecological conditions of solitary sites on the Ljubljansko barje and, consequently, also the special floristic composition, we find that it is a new silver fir association *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova.

2 METHODS

We inventoried both silver fir sites according to the Central European method (BRAUN-BLANQUET 1964) and continued the research in the sense of this method. Mala flora Slovenije (MARTINČIČ et al. 2007) is the

nomenclature source for the names of ferns and seed plants. The nomenclature source for the names of mosses was *Kleine Kryptogamenflora* (GAMS 1957).

3 ECOLOGICAL CONDITIONS

Ljubljansko barje is located in an area with a mean annual air temperature of 21 °C and mean annual precipitation of 1500 mm (ATLAS klime SFRJ 1969). The microclimate of the solitary sites is probably a little colder, with higher air humidity, caused by occasional more or less extensive flooding in the locality. In general, the area is classified into continental climate.

The bedrock of the solitary sites is of tertiary age. It could be classified into light grey massiv limestone. In some parts there can be a colourful bedrock of sandstone and tuffite limestone, interspersed in places with chert (GRAD & FERJANČIČ 1968). In our case we consider that massiv limestone predominates.

We did not perform more detailed research of the soils. In view of the temporary review of the soils we classify them into carbonate brown soils on limestone (brown calcareous soil, Chromic Cambisols) or even into dystric brown soils on sandstone (GRČMAN et al. ed. 2015). The soils are interwoven mosaically but brown calcareous soils predominate, which is also indicated by the majority basophilous flora. The surrounding for the most part eutric or dystric amphigley in the peat soils does not have an influence on the studied objects because both sites are raised a few metres above the mire (peat) ground.

² Ž. KOŠIR (1994, 2010) distinguishes a number of fir associations, which are supposed to be made from subassociations of fir-beech forest but this has not been scientifically proved.

4 RESULTS AND DISCUSSION

Structure of the association

Silver fir – *Abies alba* is dominant in both stands of the new association – *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova; other tree species, pedunculate oak – *Quercus robur*, sessile oak – *Q. petraea*, European ash – *Fraxinus excelsior*, sycamore – *Acer pseudoplatanus*, wych elm – *Ulmus glabra* are associated with it. In the second site (as in the second relevé), planted spruce – *Picea abies* is present in a larger amount. In terms of floristic composition, the association is very uniform, diagnostic species of the order *Fagetalia sylvatica*, class *Querco-Fagetea* absolutely predominate in it and for sinsystematic classification, southeast European-Illyrian species of the alliance *Aremonio-Fagion* are important. We additionally classify to southeast European-Illyrian species the acidophilous species *Aposeris foetida*. Because of the extremely small number of species, we classified species from the alliances *Carpinion* (*Vincaminor*, *Rosa arvensis*, *Prunus avium*), *Tilio-Acerion* (*Staphylea pinnata*), *Quercetalia pubescentis* (*Fraxinus ornus*, *Sorbus aria*, *Homalothecium lutescens*) and *Quercetalia roboris-petraeae* (*Quercus robur*) into the class *Querco-Fagetea*, where they also belong in terms of hierarchical sinsystematic values. Species, diagnos-

tic for the alliance of maple and elm are characteristic species of moist forests, which are joined by tall herb species in which could be classified also hygrophilous Illyrian species *Lamium orvala*, which with its coverage characterizes the researched community. Of types of beech forest, the following are moisture loving: *Galeobdolon flavidum*, *Pulmonaria officinalis*, *Sambucus nigra* and *Arum maculatum*. To hygrophilous species could be added the mesophilous species *Aegopodium podagraria*, which is very widespread in some places.

The biological spectrum of the association *Lamio orvalae-Abietetum* shows that the living conditions of the phytocoenosis are more or less normal for survival or they correspond to the living conditions of the temperate zone. The stands of this association thrive in more or less favourable site conditions but not in optimal ones (Table 1). This is also confirmed by horological analysis of the geoelements, which indicates prevailing colder floral elements (European, Euroasiatic, Eurosiberian, Circumboreal, Paleotemperate, Alpine-Carpathian, Arctic-Alpine species) (Table 2). Among them the most numerous are European and Euroasiatic geoelements, which in terms of their distribution are also the commonest in the temperate zone.

Table 1: Biological spectrum of the association *Lamio orvalae-Abietetum*

Life form	number	%
PHANEROPHYTES	22	28.6
Stemmed (P. scap.)	10	13.0
Tufted (P. caesp.)	6	7.8
Nanophanerophyte	4	5.2
Climbing (P. lian.)	2	2.6
CHAMAEPHYTES	9	11.7
Mosses (B. Ch.)	8	10.4
Creepers (Ch. rept.)	1	1.3
HEMICRYPTOPHYTES	26	33.8
Stemmed (H. scap.)	16	20.8
Rosette (H. ros.)	4	5.2
Tufted (H. caesp.)	3	3.9
Creepers (H. rept.)	2	2.6
Biennials (H. bien.)	1	1.3
GEOPHYTES	19	24.6
with rhizomes (G. rhiz.)	17	22.0
with bulbs (G. bulb.)	2	2.6
TEROPHYTES	1	1.3
Stemmed (T. scap.)	1	1.3
TOTAL	77	100.0

Table 2: Horological groups (Poldini 1991) in the association *Lamio orvalae-Abietetum*

GEOELEMENTS	number	%
European	21	27.3
Euroasiatic	11	14.2
Mediterranean-montane	7	9.1
Eurosiberian	7	9.1
Circumboreal	5	6.5
Paleotemperate	4	5.2
Pontic	4	5.2
Mediterranean-Atlantic	3	3.9
Northern Illyrian	2	2.6
Southern Illyrian	1	1.3
Mediterranean-Pontic	1	1.3
Alpine-Carpathian	1	1.3
Arctic-Alpine	1	1.3
Cosmopolitan	1	1.3
Unspecified mosses	8	10.4
TOTAL	77	100.00

Characteristic and differential species

In accordance with the ecological conditions of the phytocoenosis of the association *Lamio orvalae-Abietetum* we decided on the following characteristic species of the association: *Abies alba*, Mill. a montane-Mediterranean species that dominates other associated tree species. It is characteristic that it gives preference to habitats with greater soil and atmospheric moisture. It is similar with the Northern Illyrian species *Laminum orvala* L., which has abundant and optimal growth and dense settlement under the aforementioned ecological conditions, which is expressed by high median cover values. The species *Laminum orvala* with other South-east-European-Illyrian species (*Hacquetia epipactis*, *Omphalodes verna*, *Cyclamen purpurascens*, *Calamintha grandiflora*, *Aremonia agrimonoides*) places the association in the Illyrian phytogeographic province and Illyrian alliance *Aremonio-Fagion*. We also chose *Vinca minor* L. as a characteristic species of the association, which is otherwise widespread from Galicia in Spain, southern England, Central Europe and through Pannonia to the east. Despite its wide distribution, MEUSEL et al. (1978) stress its primary distribution in

the Northern Illyrian space. Sites of the association *Lamio orvalae-Abietetum* suit it because it is a fresh to moisture-loving species of the colline belt.

As distinguishing species of the association *Lamio orvalae-Abietetum* we chose the European species *Fraxinus excelsior* and *Quercus robur*. Both species occupy moist habitats or merely fresh soil more or less intermixed with silicate rocks, as is probable in our case. Both species are or were native to the Ljubljansko barje, where they construct or constructed independent stands of peat forest phytocoenoses. They have a subordinate role in the association *Lamio orvalae-Abietetum* but indicate the wider ecological conditions of the area.

The nomenclature definition of the association is: *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova.

Holotype: relevé 1 in phytocenological table.

Characteristic species of the association: *Abies alba*, *Laminum orvala*.

Differential species of the association: *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*.

We classify the association into the Illyrian alliance *Aremonio-Fagion*.

5 CONCLUSIONS

Phytocoenoses of the association *Lamio orvalae-Abietetum* are governed by the ecological conditions that prevail on the Ljubljansko barje. In this area there is more atmospheric and slightly increased ground moisture. Ground moisture is mainly dependent on the bedrock parent material, which is mosaically interwoven between the predominant limestone and a minor part of sandstone. Various soils have developed on the different bedrock: from the majority carbonate brown to the minority moister dystic brown soils. The openness and non-forested nature of the Ljubljansko barje enable major oscillations of daily and annual temperature, especially with a lack of wind. The damp cold and the soaked peat soils contribute to the low temperature, especially in early spring, autumn and winter. These ecological conditions favour more mesophilous flora of beech forests, which in this phytocenosis prevail over the expected flora of plains.

Phytocoenoses of the association *Lamio orvalae-Abietetum* approximate floristically and ecologically to lower mountain phytocoenoses of the association *Abieti-Fagetum clematidosum* Tregubov 1958 nom. mscr. KOŠIR (1994: 67) classified these phytocoenoses into an independent association *Clematido vitalbae-Abietetum* (Tregubov 1958 n. inver.). Ž. KOŠIR 1994 nom. prov. (DAKSKOBLER & MARINČEK 2009: 50). Ž. KOŠIR (1994: 67) finds that the phytocenosis of the association *Clematido vitalbae-Abietetum* (= *Abieti-Fagetum clematidosum*) grows on a mixed carbonate-noncarbonate geological basis, which is similar to the

association *Lamio orvalae-Abietetum*. The findings of Košir are to date general and it is necessary to restudy lowland stands of the sub-association *Abieti-Fagetum clematidosum*: whether it is an extra zonal beech or an independent fir phytocenosis, which would even be possible to classify into the association *Lamio orvalae-Abietetum*. KUTNAR et al. (2012: 205) favoured a sub-association, which is validly described as *Omphalodo-Fagetum* (Tregubov 1957) Marinček et al. 1993 var. geogr. *Calamintha gradiflora* Surina 2002 *asaretosum europaeae* Puncer 1980 (= *Omphalodo-Fagetum* (Tregubov 1957) Marinček et al. 1963 *clematidosum*). In view of the incompleteness of Košir's (1994, 2010) formation of the lowland fir-beech association *Omphalodo (Abieti)-Fagetum clematidosum* in *Clematido-Abietetum*, we include our association *Lamio orvalae-Abietetum*, as it is now known, among the first in the Illyrian alliance of beech forests *Aremonio-Fagion*.

The question arises of whether perhaps the association *Lamio orvalae-Abietetum* is a different association in which there should be managed (cut) beech in a lowland form of fir-beech forest, i.e., in the subassociation *Omphalodo Fagetum clematidosum*. This is not very likely because we did not find beech in the census plots, nor a high cover value of the leading distinguishing species of the subassociation *Clematis vitalba*. Neutral and acidic fir forests thrive at lower altitudes, where there is enough atmospheric humidity and adequately acidic soil for our stands.

ACKNOWLEDGMENTS

The author is grateful to Dr. Igor Dakskobler for reviewing the article and valuable advice.

The author is grateful to Vinko Žagar for technical assistance in producing the phytocenological tables.

PHYTOCOENOLOGICAL TABLE (Fitocenološka tabela)

LAMIO ORVALAE-ABIETETUM ass. nova

Sinsistematska characteristic (Sinsistematska pripadnost)	Number of relevé (Zaporedna številka popisa)	1	2		
	Altitude in m (Nadmorska višina v m)	335	310		
	Aspect (Nebesna lega)	SE	-		
	Slope in degrees (Nagib v stopinjah)	5-10	0		
	Bedrock (Geološka podlaga)		limestone (apnenec)		
	Stoniness in % (Kamnitost v %)	10	0		
	Cover (Pokrovnost) %: Tree layer (drevesna plast)	I	80	60	
	Shrub layer (grmovna plast)	II	70	30	
	Herb layer (zeliščna plast)	III	60	100	
	Moss layer (mahovna plast)	IV	10	10	
	Relevé (Velikost popisne ploskve) m ²		400	400	
	Location (Kraj popisov)		Ljubljansko barje		Presence (Prezenca)
			Ig	Kot	

LAMIO ORVALAE-ABIETETUM ass. nova

CHARACTERISTIC SPECIES OF ASSOCIATION (Značilnice)

		1	2		
VP ₃	Abies alba	I	4.2	3.1	2
		II	2.2	+	2
F ₁	Lamium orvala	III	2.2	4.4	2

DISTINGUISHING SPECIES OF ASSOCIATION (Razlikovalnici)

		1	2		
AU	Fraxinus excelsior	I	1.1	1.1	2
		II	3.2	1.2	2
RP ₂	Quercus robur	I	1.1	1.1	2
		II	+	.	1

• F₁ AREMONIO-FAGION (Ht. 1938) Török, Podani & Borhidi in Borhidi 1989

		1	2		
	Lamium orvala	III	2.2	4.4	2
	Hacquetia epipactis		+	1.2	2
	Omphalodes verna		1.1	+	2
	Cyclamen purpurascens		+	+	2
	Calamintha grandiflora		+2	.	1
	Aremonia agrimonoides		+	.	1

F₂ FAGETALIA SYLVATICAE Pawl. 1928 s. lat.

		1	2		
	Acer pseudoplatanus	I	1.1	2.1	2
		II	.	2.2	1
	Eurhynchium zetterstedtii	IV	1.3	2.4	2
	Galeobdolon flavidum	III	2.2	1.1	2
	Pulmonaria officinalis		1.2	1.2	2
	Sambucus nigra	II	+	1.2	2
	Ulmus scabra	I	1.1	.	1
		II	+	+	2
	Asarum europaeum	III	+2	+2	2
	Carex sylvatica		+	+2	2

Number of relevé (Zaporedna številka popisa)		1	2	
Actaea spicata		+	+	2
Lilium martagon		+	+	2
Primula vulgaris		+	+	2
Ranunculus lanuginosus		+	+	2
Viola reichenbachiana		+	+	2
Arum maculatum		.	1.2	1
Galium laevigatum		1.1	.	1
Galium odoratum		.	1.1	1
Mercurialis perennis		+2	.	1
Symphytum tuberosum		+2	.	1
Adoxa moschatellina		.	+	1
Brachypodium sylvaticum		.	+	1
Campanula trachelium		+	.	1
Daphne mezereum	II	+	.	1
Euphorbia dulcis	III	+	.	1
Geranium robertianum		+	.	1
Helleborus odoratus		.	+	1
Lathyrus vernus		+	.	1
Mycelis muralis		+	.	1
Neottia nidus-avis		+	.	1
Paris quadrifolia		.	+	1
Polygonatum multiflorum		+	.	1
Salvia glutinosa		+	.	1
Sanicula europaea		+	.	1
Scrophularia nodosa		+	.	1
F ₃ QUERCO-FAGETEA Br.-Bl. & Vlieger in Vlieger 1937				
		1	2	
Anemone nemorosa	III	2.2	1.1	2
Vinca minor		1.2	1.1	2
Fraxinus excelsior	I	1.1	1.1	2
	II	3.2	1.1	2
Quercus robur	I	1.1	1.1	2
	II	+	.	1
Corylus avellana		1.1	1.1	2
Quercus petraea	I	2.1	.	1
TA Staphylea pinnata	II	1.1	.	1
Q ₂ Camptothecium lutescens	IV	+3	.	1
Ctenidium molluscum		+3	.	1
Isothecium myosuroides		+3	.	1
Carex digitata	III	+2	.	1
Clematis vitalba	II	+	.	1
Q ₂ Euonymus verrucosa		+	.	1
Q ₂ /OO Fraxinus ornus		+	.	1
Hedera helix		+	.	1
Lonicera xylosteum		+	.	1
Moehringia trinervia	III	+	.	1
C Prunus avium	II	+	.	1
C Rosa arvensis		+	.	1
Q ₂ Sorbus aria		+	.	1
P Viburnum opulus		+	.	1

Number of relevé (Zaporedna številka popisa)		1	2		
A ₃	BETULO-ADENOSTYLETEA Br.-Bl. et R. Tx. 1943 s. lat. (=MULGEDIO-ACONITETEA Hadač & Klika in Klika & Hadač 1944 s. lat.)				
			1	2	
	Dryopteris filix-mas	III	1.2	+	2
	Senecio ovatus		1.1	.	1
	Rubus idaeus	II	+	.	1
VP ₃	VACCINIO-PICEETEA Br.-Bl. in Br.-Bl. et al. 1939 em. Zupančič (1998) 2000 s. lat.				
			1	2	
	Abies alba	I	4.2	3.1	2
		II	2.2	+	2
	Picea excelsa	I	1.1	3.1	2
		II	+	.	1
	Oxalis acetosella	III	1.1	2.2	2
	Rubus hirtus	II	3.3	.	1
	Hypnum cupressiforme	IV	+3	.	1
	Thuidium tamariscinum		+2	.	1
•	Aposeris foetida	III	+	.	1
O	OTHER SPECIES (Ostale vrste)				
			1	2	
ART	Aegopodium podagraria	III	.	2.2	1
EP ₂	Carex alba		+	.	1
EP ₂	Fragaria vesca		+	.	1
EP ₂	Myosotis sylvatica		.	+	1
TG	Veronica chamaedrys		+	.	1
M	MOSSES (Mahova)				
			1	2	
	Mnium sp.	IV	+3	+4	2
	Mnium sp.		+2	.	1

LEGEND (Legenda)

- C CARPINION Issl. 1931 em. Oberd. 1953 s. lat.
 AU ALNO-ULMION Br.-Bl. & R. Tx. 1943
 TA TILIO-ACERION Klika 1955
 RP₂ QUERCETALIA ROBORIS-PETRAEAE R. Tx. (1931) 1937 s. lat.
 Q₂ QUERCETALIA PUBESCENTIS-PETRAEAE Br.-Bl. 1931
 OO FRAXINO ORNI-OSTRYION Tomažič 1940
 P PRUNETALIA SPINOSAE R. Tx. 1952 s. lat.
 ART ARTEMISIETEA Lohm., Prsg. & R. Tx. in R. Tx. 1950 s. lat.
 E EPILOBIETEA ANGUSTIFOLII R. Tx. & Prsg. in R. Tx. 1950 s. lat.
 TG TRIFOLIO-GERANIETEA SANGUINEI Th. Müller 1961 s. lat.

REFERENCES - LITERATURA

- ATLAS klime SFRJ 1969. Hidrometeorološka služba SFRJ. Beograd.
- BRAUN - BLANQUET, J., 1964: *Pflanzensoziologie*. Wien-New York.
- DAKSKOBLER, I. & L. MARINČEK, 2009: *Pregled jelovih rastišč v Sloveniji*. Zbornik gozdarstva in lesarstva (Ljubljana) 89: 43–54.
- GAMS, H., 1957: *Kleine Kryptogamenflora*. Stuttgart.
- GRAD, K. & L. FERJANČIČ, 1968: *Tolmač in karta Kranj L 33–65*. Osnovna geološka karta 1 : 100.000 SFRJ. Beograd.
- GRČMAN, H., N. J. VIDIC, M. ZUPAN, F. LOBNIK, A. JONES & L. MONTANARELLA (uredniki), 2015: *Tla Slovenije s pedološko karto v merilu 1 : 250.000*. European Commission Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability. Ljubljana.
- KOŠIR, Ž., 1994: *Ekološke in fitocenološke razmere v gorskem in hribovskem jugozahodnem obdobju Panonije*. Zveza gozdarskih društev Slovenije. Ljubljana.
- KOŠIR, Ž., 2010: *Lastnosti gozdnih združb kot osnova za gospodarjenje po meri narave*. Zveza gozdarskih društev Slovenije. Gozdarska založba Ljubljana.
- KUTNAR, L., Ž. VESELIČ, I. DAKSKOBLER & D. ROBIČ, 2012: *Tipologija gozdnih rastišč Slovenije na podlagi ekoloških in vegetacijskih razmer za potrebe usmerjanja razvoja gozdov*. Gozdarski vestnik (Ljubljana) 70 (4): 195–214.
- MARTINČIČ, A., T. WRABER, N. JOGAN, A. PODOBNIK, B. TURK & B. VREŠ, 2007: *Mala flora Slovenije*. Ljubljana.
- MEUSEL, H., E. JÄGER, S. RAUSCMERT & E. WEINERT, 1978: *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora*. II. Jena.
- POLDINI, L., 1991: *Atlante corologico delle Piante Vascolari nel Friuli - Venezia Giulia*. Udine.
- ŠILC, U. & A. ČARNI, 2012: *Conspectus of vegetation syntaxa in Slovenia*. Hacquetia (Ljubljana) 11 (1): 112–164.
- TREGUBOV, V., 1962: *Associations du groupe Abieti-Piceetum dela region karstique occidentale des alpes Dinariques*. Mitt. Ostalpi-din. pfalnz. Arbietsgem. 2: 39–46.
- WRABER, M., 1946: *Rastlinska biološka oblika – zrcalo življenjskih pogojev*. Prirodoslovno društvo (Ljubljana): 1–11.

POVZETEK

Pred časom, maja 1997, sem fitocenološko popisal zanimivi jelkine fitocenozi na dveh osamelcih Ljubljanskega barja (Ig, 335 m; Kot, 310 m n.m.). Porasla sta bila s pretežnim delom jelke v družbi s posameznim velikim jesenom, dobom, belim javorjem in golim brestom. Omenjena sopotna drevesa so znanilci svežih do vlažnih tal, kar prija tudi jelki. Poleg omenjenih drevesnih vrst sta prisotna še graden in smreka. Smreka je večinoma sekundarno vnesena v jelove sestoje. Prisotnost gradna je normalna v sklopu prej omenjenih drevesnih vrst, čeprav porašča prej sušna kot vlažna tla, sicer pa se ne izogiba svežih tal. Glede na količinsko prisotnost jelke ugotavljamo, da gre za jelovo združbo na svežih karbonatnih tleh in vlažno zračno klimo, zlasti v jesenskem in deloma pomladanskem

obdobju. Zdaj poznamo v Sloveniji okoli dvanajst jelovih združb, od teh sedem na kislih in pet na karbonatnih tleh. Opisalo jih je osem raziskovalcev: Belec, Horvat, Ž. Košir³, Marinček, Oberdorfer, Vukelić & Baričević, Wraber (v ŠILC & ČARNI 2012) in TREGUBOV (1962). Najbolj razširjene in na večjih površinah so kisloljubne jelove združbe *Bazzanio-Abietetum* M. Wraber 1958, *Galio rotundifolii-Abietetum* M. Wraber 1959 in *Dryopterido affinis-Abietetum* Ž. Košir nom. inval. Vse druge jelove združbe se pojavljajo na manjših površinah. Glede na prej omenjene ekološke razmere osamelcev Ljubljanskega barja in s tem posledično na posebno floristično sestavo ugotavljamo, da gre za novo jelovo združbo *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova.

³ Ž. KOŠIR (1994, 2010) loči več jelovih združb, ki naj bi bile izvedene iz subasociacij dinarskega jelovo-bukovega gozda, česar pa ni znanstveno dokazal.

METODA

Obe rastišči jelove združbe smo popisali po srednjeevropski metodi (BRAUN-BLANQUET 1964), in po tej metodi nadaljevali raziskave. Mala flora Slovenije (MAR-

TINČIČ et al. 2007) je bila nomenklaturni vir za imena praprotnic in semenk. Nomenklaturni vir za imena mahov je bil *Kleine Kryptogamenflora* (GAMS 1957).

EKOLOŠKE RAZMERE

Ljubljansko barje se nahaja v območju s srednjo letno temperaturo zraka 21 °C in s srednjo letno količino padavin 1500 mm (ATLAS klime SFRJ 1969). Verjetno pa je mikroklima osamelcev nekoliko hladnejša z večjo zračno vlago, ki jo povzroča občasno bolj ali manj obsežno poplavljanje v okolici. V splošnem uvrščamo območje v kontinentalno klimo.

Geološka podlaga osamelcev je terciarne starosti. Uvrstili bi jo v svetlosiv neplastovit apnenec. V nekaterih predelih je lahko pisana podlaga peščenjaka in tu-fitnega apnenca, ki mu je ponekod primešan roženec

(GRAD & FERJANČIČ 1968). V našem primeru ocenjujemo, da prevladuje neplastovit apnenec.

Podrobnejših raziskav tal nismo opravili. Glede na začasen pregled tal jih uvrščamo v rjava karbonatna tla na apnencu ali celo v distrična tla na peščenjakih (GRČMAN et al. ur. 2015). Tla se mozaično prepletajo, vendar prevladujejo rjava karbonatna tla, kar nakazuje tudi večinska bazofilna flora. Okoliški večinsko evtrični ali distrični amfiglej na barjanskih tleh nima vpliva na tla na raziskovanih objektih, ker sta oba objekta nekaj metrov dvignjena nad barjanskimi tlemi.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Zgradba združbe

V združbi jelke in velike mrtve koprive – *Lamio orvalae-Abietetum* ass. nova je dominantna jelka – *Abies alba*, ostale drevesne vrste dob – *Quercus robur*, graden – *Q. petraea*, veliki jesen – *Fraxinus excelsior*, beli javor – *Acer pseudoplatanus*, goli brest – *Ulmus glabra* so ji pridružene. Na drugem rastišču (Kot, v drugem popisu), je v večji količini prisotna zasajena smreka – *Picea abies*. Po florističnem sestavu je združba zelo enotna, v njej absolutno prevladujejo diagnostične vrste iz reda *Fagetalia sylvaticae*, razreda *Quercio-Fagetea*, in za sinsistematsko opredelitev pomembne jugovzhodnoevropsko-ilirske vrste ilirske zveze *Aremonio-Fagion*. K jugovzhodnoevropsko-ilirskim vrstam uvrščamo še kisloljubno vrsto *Aposeris foetida*. V razred *Quercio-Fagetea* smo zaradi izredno majhnega števila vrt uvrstili vrste iz zvez *Carpinion* (*Vincetoxicum minor*, *Rosa arvensis*, *Prunus avium*), *Tilio-Acerion* (*Staphylea pinnata*), *Quercetalia pubescentis* (*Fraxinus ornus*, *Sorbus aria*, *Homalothecium lutescens*) in *Quercetalia roboris-petraeae* (*Quercus robur*), kamor po hierarhični sinsistematski vrednosti tudi pripadajo. Vrste diagnostične za zvezo javorjev in brestov so znanilke vlažnih gozdov, ki se jim pridružujejo vrste visokih steblik (*Dryopteris filix-mas*, *Senecio ovatus*, *Rubus idaeus*) sem bi lahko uvrstili še vlagoljubno vrsto *Lamium orvala*, ki s svojo

veliko pokrovnostjo označuje preučevano združbo. Od diagnostičnih vrst bukovih gozdov so vlagoljubne še naslednje: *Galeobdolon flavidum*, *Pulmonaria officinalis*, *Sambucus nigra* in *Arum maculatum*. K vlagoljubnim vrstam bi dodali še mezofilno vrsto *Aegopodium podagraria*, ki je na nekaterih mestih zelo razširjena.

Biološki spekter asociacije *Lamio orvalae-Abietetum* kaže, da so življenjske razmere fitocenoz bolj ali manj normalne za preživetje oziroma ustrezajo življenjskim razmeram zmerne pasu. Združba uspeva v bolj ali manj ugodnih rastiščnih razmerah, vendar ne v optimalnih (Tabela 1). To potrjuje tudi horološka analiza geoelementov, ki kaže na prevlado hladnejših flornih elementov (evropske, evroazijske, evrosibirske, cirkumborealne, paleotemperatne, alpsko-karpat-ske, arsko-alpske vrste) (Tabela 2.) Med temi sta najštevilčnejša evropski in evrazijski geoelement, ki sta glede na svojo razširjenost tudi najbolj pogosta v zmerne pasu.

Značilnice in razlikovalnici

Skladno z ekološkimi razmerami obeh preučenih fitocenoz asociacije *Lamio orvalae-Abietetum* smo se odločili za naslednje značilnice asociacije: *Abies alba*, Mill.

montansko-mediteranska vrsta, ki dominira nad drugimi pridruženimi drevesnimi vrstami. Zanj je značilno, da daje prednost rastiščem z večjo talno in zračno vlago. Podobno je s severnoilirsko vrsto *Laminum orvala* L., ki ima v prej omenjenih ekoloških razmerah bujno in optimalno rast ter gosto naseljenost, ki je izražena z veliko srednjo pokrovno vrednostjo. Vrsta *Laminum orvala* z drugimi jugovzhodnoevropsko-ilirskimi vrstami (*Hacquetia epipactis*, *Omphalodes verna*, *Cyclamen purpurascens*, *Calamintha grandiflora*, *Aremonia agrimonoides*) kaže na pripadnost nove združbe k fitogeografski provinci in ilirski zvezi *Aremonio-Fagion*.

Za razlikovalnice asociacije *Lamio orvalae-Abietetum* smo izbrali evropski vrsti *Fraxinus excelsior* L. in *Quercus robur* L. Obe vrsti naseljujeta vlažna rastišča

ali le sveža tla, ki jim je bolj ali manj primešana silikatna kamnina, kar je v našem primeru verjetno. Obe vrsti sta ali sta bili doma na Ljubljanskem barju, kjer gradita ali sta gradili samostojne sestoje barjanskih gozdnih fitocenoz. V asociaciji *Lamio orvalae-Abietetum* imata podrejeno vlogo, vendar nakazujeta širše ekološke razmere območja.

Nomenklaturna opredelitev asociacije je:

Lamio orvalae-Abietetum ass. nova.

Holotip: popis 1 v fitocenološki tabeli.

Značilnice asociacije: *Abies alba*, *Laminum orvala*.

Razlikovalnici asociacije: *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*.

Asociacijo uvrščamo v ilirsko zvezo *Aremonio-Fagion*.

SKLEP

Fitocenoze asociacije *Lamio orvalae-Abietetum* so pogojene z ekološkimi razmerami, ki vladajo na Ljubljanskem barju. Na tem območju je več zračne in nekoliko povečane talne vlažnosti. Vlažnost tal je predvsem odvisna od geološke podlage, ki se mozaično prepleta med pretežnim delom apnenca in manjšim delom peščenjaka. Na različnih geoloških podlagah so razvita različna tla: od večinskih karbonatnih rjavih do manjšinskih vlažnejših dističnih rjavih tal. Odprtost in negozdnatost Ljubljanskega barja omogočata velika nihanja dnevne in letne temperature, zlasti ob brezvetrju. Nižjo temperaturo povzročajo tudi vlažna hladna in namočena barjanska tla, zlasti v zgodnjepomladanskem, jesenskem in zimskem času. Te ekološke razmere ugajajo bolj vlagoljubnemu rastlinstvu, ki v preučevani združbi prevladuje nad rastlinstvom v okoliških kolinskih belogabrovih in bukovih gozdovih. Od pogostih vrst v teh gozdovih so posamično zastopane *Asarum europaeum*, *Helleborus odoratus*, *Primula vulgaris*, pogostejša je le vrsta *Vinca minor*. (Glej Fitocenološko tabelo).

Fitocenoze asociacije *Lamio orvalae-Abietetum* se floristično in ekološko približujejo spodnjegorski fitocenozi asociacije *Abieti-Fagetum clematidetosum* Tregubov 1958 nom. mscr. Košir (1994: 67) je to fitocenozo uvrstil v samostojno asociacijo *Clematido vitalbae-Abietetum* (Tregubov 1958 n. inver.) Ž. Košir 1994 nom. prov. (DAKSKOBLER & MARINČEK 2009: 50). Ž. Košir (1994: 67, 2010) ugotavlja, da fitocenoza asociacije *Clematido vitalbae-Abietetum* (= *Abieti-Fagetum clematidetosum*) porašča mešano karbonatno-nekar-

bonatno geološko podlago, kar je podobno kot pri asociaciji *Lamio orvalae-Abietetum*. Ugotovitve Koširja so do sedaj splošne in potrebno bi bilo ponovno preučiti nižinske sestoje subasociacije *Abieti-Fagetum clematidetosum*: ali gre za ekstraconalno bukovo ali samostojno jelovo fitocenozo, ki bi jo bilo celo moč uvrstiti v asociacijo *Lamio orvalae-Abietetum*. KUTNAR et al. (2012: 205) so se opredelili za subasociacijo, ki je veljavno opisana kot *Omphalodo-Fagetum* (Tregubov 1957) Marinček et al. 1993 var. geogr. *Calamintha grandiflora* Surina 2002 *asaretosum europaeae* Puncer 1980 (= *Omphalodo-Fagetum* (Tregubov 1957) Marinček et al. 1963 *clematidetosum*).

Glede na nedorečenost KOŠIRJEVEGA (1994, 2010) preoblikovanja nižinske jelovo-bukove združbe *Omphalodo (Abieti)-Fagetum clematidetosum* v *Clematido-Abietetum* našo asociacijo *Lamio orvalae-Abietetum*, kot je sedaj znano, med prvimi vključujemo v ilirsko zvezo bukovih gozdov *Aremonio-Fagion*.

Pojavlja se vprašanje ali je morda asociacija *Lamio orvalae-Abietetum* drugotna združba, v kateri naj bi bila izgospodarjenja (izsekana) bukev v nižinski obliki jelovo-bukovega gozda, to je v subasociaciji *Omphalodo Fagetum clematidetosum*. Ta domneva je malo verjetna, ker v popisnih ploskvah nismo izsledili bukve, kot tudi ne visoke pokrovnosti vodilne razlikovalnice subasociacije *Clematis vitalba*. Nevtralni in kisli jelovi gozdovi pa uspevajo v nižjih nadmorskih višinah, kjer je dovolj zračne vlage in primerno zakisana tla, podobno velja za naša sestoja.

BLESTEČA KRVOMOČNICA (*GERANIUM LUCIDUM* L.), NOVOST V FLORI SLOVENSKEGA DELA JULIJSKIH ALP

GERANIUM LUCIDUM L., A NOVELTY IN THE FLORA OF SLOVENIAN PART OF THE JULIAN ALPS

Amadej TRNKOCZY¹ & Igor DAKSKOBLER²

Received August 27, 2016; accepted December 16, 2016.
Delo je prispelo 27. avgusta 2016, sprejeto 16. decembra 2016.

IZVLEČEK

Blesteča krvomočnica (*Geranium lucidum* L.), novost v flori slovenskega dela Julijskih Alp

Opisujemo nova nahajališča vrste *Geranium lucidum* v Trnovskem gozdu in njeno nenavadno pojavljanje v dolini zgornje Soče med vasema Soča in Trenta v Julijskih Alpah. V Trnovskem gozdu so njena nahajališča skalnati altimontanski bukovi gozdovi, ki jih uvrščamo v asociacijo *Isopyro-Fagetum*, deloma tudi meliščne združbe, v spodnjem delu doline Trente pa ruderalizirana travišča in kamnite groblje v bližini človekovih bivaljš oz. med prometnico in reko Sočo. Menimo, da so ta nahajališča najbrž sekundarna ali subspontana. Njena semena bi v Trento lahko prinesla divjad (jelenjad), lahko je bilo vsebovano v mešanici zemlje okrasnih rastlin, manj verjetno tudi v krmi za konje v času prve svetovne vojne ali v materialu za vzdrževanje cest. Drugod v Sloveniji podobnega subspontanega pojavljanja te vrste do zdaj niso opisali, v svetovnem merilu pa je zanjo znano invazivno širjenje zunaj naravnega areala.

Ključne besede: *Geranium lucidum*, nitrofilne ruderalne združbe, Trenta, Julijske Alpe, Triglavski narodni park, Slovenija

ABSTRACT

***Geranium lucidum* L., a novelty in the flora of Slovenian part of the Julian Alps**

New localities of *Geranium lucidum* in Slovenia are described. They are located in the Trnovski Gozd region and surprisingly in a rather dislocated locality in the Trenta Valley between villages Soča and Trenta (the Julian Alps). In the Trnovski Gozd Plateau the species grows in stony altimontane beech forests, classified into the association *Isopyro-Fagetum*, partly also in scree communities. In the Trenta Valley we found it on partly ruderal grassland and on a stone and rock heap, both close to a human dwelling and a regional road. We assume these localities to be secondary or subspontaneous. Different potential ways (means) of introduction of the plant are discussed. The most probable agent seems to be large mammal game (particularly red-deer, *Cervus elaphus*) and as less probable option we presume by seed infected soil of purchased horticultural plants. It appears quite improbable that the seeds have been introduced by materials used in maintaining works of the road or during the First World War in large amounts of hay needed to feed numerous army horses and mules present on nearby front lines. Similar subspontaneous occurrences of this species in Slovenia are so far unknown, although in global scale the species is known as invasive and spreading.

Key words: *Geranium lucidum*, nitrophilous ruderal communities, Trenta, Julian Alps, Triglav National Park, Slovenia

¹ Dr. Amadej Trnkoczy, Trenta 2b, SI-5232 Bovec, amadej.trnkoczy@siol.net

² Dr. Igor Dakskobler, the Jovan Hadži Institute of Biology of the Scientific Research Centre of the Slovenian Academy of Sciences and Arts, Regional research unit, Brunov drevored 13, SI-5220 Tolmin and Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana, Department of Forestry and Renewable Forest Resources, Večna pot 83, SI-1000 Ljubljana, igor.dakskobler@zrc-sazu.si

1 UVOD

Blesteča krvomočnica (*Geranium lucidum* L.) je mediteranska (AESCHIMANN et al. 2004, FISHER et al. 2005, LAUBER et al. 2012) oz. mediteransko-subatlantska vrsta (ANONIMOUS 2016). Razširjena je v vseh mediteranskih deželah (SCHONFELDER 2002) od Gibraltarja do vzhodnega Mediterana in naprej na vzhod do Krima (BLAMEY & GRAY-WILSON 2004). Raste tudi drugod po Evropi od nižinskega do gorskega pasu. Atlas britanske in irske flore (ANONIMOUS 2016) navaja njeno prisotnost v skoraj celotni Veliki Britaniji. Drug spletni vir (ANONYMOUS 2013) navaja njena nahajališča v Španiji, Franciji, Nemčiji, na Švedskem in Norveškem. Raste tudi na Srednjem Vzhodu, na Kavkazu in v delih Himalaje z zmernim podnebjem (AEDO et al. 1998). Po celotni razširjenosti ta vrsta ni vezana izključno na (sub)Mediteran in njegovo podnebje. Po nekaterih virih (ANONYMOUS 2013) uspeva tudi v drugačnih podnebnih razmerah (po Köpen-Geiger): v stepah (Geo-C3) v Maroku in Španiji, v subtropskem vlažnem podnebjem (Geo-C6) v Pakistanu, Azarbejdžanu in Turčiji, v atlantskem podnebjem (Geo-C7) v Franciji in Veliki Britaniji, v celinskem podnebjem s toplimi poletji (Geo-C8) v Pakistanu in Armeniji, v celinskem podnebjem z mrzlimi poletji (Geo-C9) na Švedskem in v subarktičnem podnebjem (Geo-C10) in tundri (Geo-C11) na Švedskem in Norveškem (zadnje ni povsem zanesljiv podatek).

V Alpah je blesteča krvomočnica razširjena precej raztreseno (AESCHIMANN et al. 2004). Najbolj pogosta je v zahodnih in jugozahodnih Alpah, deloma tudi v južnih in jugovzhodnih Alpah (provinca Verona, Brescia, Bergamo, Udine), v skrajno severovzhodnem delu Alp pa uspeva v deželi Spodnji Avstriji (Niederösterreich), kjer je zelo redka in ji grozi izumrtje (FISHER & al. 2005). Tudi v Švici je razmeroma redka in z izjemo posameznih nahajališč večinoma uspeva zunaj Alp. Pogostejša je bolj severno v pogorju Jure (LAUBER et al. 2012). Zunaj Alp so znana nahajališča tudi v Schwarzwald in v skoraj vseh južnoevropskih gorovjih (Pireneji, Apenini, francoski Centralni masiv, Balkansko gorovje, Karpati) – AESCHIMANN et al. (2004).

Vrsta je vnesena v Avstralijo, Novo Zelandijo in v več delov ZDA (kjer so jo prvič opazili leta 1971) ter Kanade (prva navedba je iz leta 1982, ANONIMOUS 2013). V ZDA se hitro širi in je ponekod že naturalizirana. Domnevajo, da je bil vnos nameren, kot (malo poznano) zdravilno zelišče (diuretik, ustavljanje krvavenja). V ZDA jo obravnavajo med nevarnejšimi invazivnimi rastlinami. V zvezni državi Washington ima status «Class A State Noxious Weed» in so jo lastniki zemljišč po zakonu dolžni kontrolirati in iztrebljati. Ogroža naravne združbe, kjer mestoma tvori goste preproge in dosega tudi 100 % zastiranje tal. Ogroža predvsem spodnjo plast svetlih hrastovih gozdov (DENNEHY et al. 2011) in obrežnih gozdov plemenitih listavcev (ANONIMOUS 2013). Njena pogostnost narašča tudi v Veliki Britaniji, kjer je sicer avtohtona (ANONIMOUS 2016).

V Sloveniji je blesteča krvomočnica razširjena predvsem v njenem jugozahodnem delu, v submediteranskem in deloma dinarskem fitogeografskem območju (slika 1). V arealni karti smo upoštevali tudi nahajališče v udornici Laška kukava na Logaški planoti jugovzhodno od Logatca (0151/2): najditelja F. Batič in I. Jurjevčič, 12. 5. 2003 (JURJEVČIČ 2004: 57), na katerega nas je opozoril BATIČ (2016, in litt.). Poznamo tudi precej oddaljeno nahajališče v preddinarskem fitogeografskem območju na Sinjem vrhu v Beli krajini (JOGAN & al. 2001, MARTINČIČ 2007). Nahajališč v alpskem fitogeografskem območju doslej ne navajajo (JOGAN et al. 2001, PLAZAR 2001, AESCHIMANN et al. 2004, MARTINČIČ 2007), pač pa so v novejšem času (POLDINI 1991 jih še ne navaja) znana v jugozahodnem prigorju Julijskih Alp v sosednji Italiji (osnovni polji 9746 in 9846 – Beneška Slovenija, v okolici vasi Čarni Varh/Črni Vrh/Montefosca tik ob slovensko-italijanski meji) – POLDINI (2002), MARTINI (2016, in litt.). V bazi Centra za kartografijo favne in flore (CKFF) je okoli 150 let stara navedba nahajališča pri Vitanju (Reichardt), na meji med alpskim (Pohorje) in subpanonskim fitogeografskim območjem, vendar je ta navedba nezanesljiva (BAČIČ 2016, in litt.), in je tudi Tone Wraber kot sodelavec projekta Flora Alpina ni upošteval.

2 METODE

Floristične in fitocenološke popise blesteče krvomočnice na nahajališčih v Trenti smo naredili po ustaljenih srednjeevropskih metodah (EHRENDORFER & HAMANN 1965, JALAS & SUOMINEN 1967, BRAUN-

-BLANQUET 1964) in jih vnesli v bazo podatkov FloVeg-Si (T. SELIŠKAR et al. 2003). To aplikacijo (in podatke, ki so hranjeni v njej) smo uporabili tudi pri pripravi arealne karte njene razširjenosti v Sloveniji (slika 1).

Nomenklaturni vir za imena praprotnic in semenk je Mala flora Slovenije (MARTINČIČ et al. 2007) in za imena sintaksonov THEURILLAT (2004) in ŠILC & ČARNI (2012). Fitocenološke popise združb, v katerih v Trenti uspeva obravnavana vrsta, smo med seboj pri-

merjali s hierarhično klasifikacijo. Uporabili smo programski paket SYN-TAX (PODANI 2001) in metodo kopičenja na podlagi povezovanja (netehtanih) srednjih razdalj (UPGMA) ter količnik različnosti 1–similarity ratio.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Nova nahajališča blesteče krvomočnice (*Geranium lucidum*) v Sloveniji

0149/2 (UTM 33TVL18) Slovenija: Primorska, Trnovski gozd, Gozd, Podrta gora in podorno območje pod njo, 800 m do 900 m nm. v., meliščne združbe in grmišče leske, rešeljike in čistilne krhlike na kamniti griži. Det. I. Dakskobler & J. Peljhan, 27. 9. 2006 in J. Peljhan, 29. 7. 2009, popis avtorjev.

0049/4 (UTM 33TVL18) Slovenija: Primorska, Predmeja, vršni del Sorteža, skalnato ovršje gore, 1200 m do 1220 m nm. v., altimontanski bukov gozd (*Isopyro-Fagetum*). Leg. & det. Igor Dakskobler, 8. 4. in 18. 6. 2014, herbarij LJS in avtorjeve fotografije.

0150/1 (UTM 33TVL28) Slovenija: Primorska, Podkraj, prisojno skalnato pobočje pod Sv. Duhom, 1200 m nm. v., bukov gozd (*Isopyro-Fagetum* s. lat. / *Pseudofumario albae-Fagetum* nom. prov.). Leg & det. I. Dakskobler, 21. 4. in 12. 6. 2015, herbarij LJS in avtorjeve fotografije.

9648/1 (UTM 33TUM93) Slovenija: Primorska, Julijske Alpe, dolina Spodnje Trente, (Zgornja) Soča, med cesto Bovec–Vršič in strugo Soče nasproti hiše Soča 46; na ruderalnem travnišču obraslem z obrežnim grmovjem in drevjem, na površini okoli 3 m x 35 m, na cestnem robu; Lat.: 46,35133, Long.: 13,69344; 510 m nm. v., Leg. & det. A. Trnkoczy, 16. 5. 2016; conf. I. Dakskobler 19. 5. 2016; herbarij LJS; avtorjeve fotografije www.calphotos.com.

9648/1 (UTM 33TUM93) Slovenija: Primorska, Julijske Alpe, dolina spodnje Trente, (Zgornja) Soča, na dveh mestih: a) delno obrasli kamniti groblji (skale in kamenje zbrano pri čiščenju okoliških travnikov) na aluvialni terasi zahodno od hiše Soča 46, ruderalno in b) na strmo spuščajočem pobočju terase do reke, ruderalno travnišče na površini okoli 12 m x 12 m, deloma pod krošnjo lipe; Lat.: 46,35111, Long.: 13,69237; 520 m do 525 m nm. v. Leg. & det. I. Dakskobler in A. Trnkoczy, 26. 5. 2016, Herbarij LJS, fotografije obeh avtorjev.

3.2 Rastiščna oznaka novih nahajališč v Trnovskem gozdu

Nova nahajališča blesteče krvomočnice v Trnovskem gozdu so v težko prehodnem skalnatem ali kamnitem svetu v montanskem in altimontanskem pasu. Na obsežnem podornem območju Griža pod Podrto goro prevladujejo groba melišča in pionirski svetli gozdovi črnega gabra (PELJHAN, mscr.), v vršnem delu Sorteža in Sv. Duha nad Podkrajem pa bukov gozdovi, ki jih uvrščamo v asociacijo *Isopyro-Fagetum* (DAKSKOBLER 2014). Na zelo skalnatih rastiščih smo to vrsto popisali tudi v Čičariji v sestojih subasociacije *Lamio orvalae-Fagetum pseudofumarietosum albae* (DAKSKOBLER & REŠČIČ 2015).

3.3 Rastiščna oznaka novega nahajališča v Spodnji Trenti

Novo nahajališče smo obiskali dvakrat. Vrsto smo našli na treh krajih in v nekoliko različnih združbah. Vsa tri nahajališča so v krogu okoli 100 m. Celotna populacija je velika in vitalna, saj je štela ob obiskih več kot sto cvetočih primerkov.

Prvič smo jo opazili na zatravljenem cestnem robu med regionalno cesto Bovec–Vršič in reko Sočo pod domačijo Soča 46, Martin (slika 2). Blesteča krvomočnica raste tik ob cesti in le nekaj metrov od reke. Rastišče je precej zasenčeno z obrežnim grmovjem in drevjem, zanj je značilna visoka talna in zračna vlaga. Geološka podlaga je deloma prod, deloma nasuta cestna brežina, talni tip je rendzina. Vrstna sestava nekoliko ruderaliziranega travnišča je v popisu 1 v preglednici 1. V njem imajo poleg te vrste največje srednje zastiranje vrste *Arrhenatherum elatius*, *Ranunculus acris*, *R. repens*, *Ajuga genevensis*, *Parietaria officinalis*, *Petasites paradoxus*, *Fragaria vesca* in *Rubus caesius*.

Drugo in tretje nahajališče sta v neposredni okolici nenaseljene domačije Soča 46, ki stoji zunaj strnjene naselja na precej ozki aluvialni terasi okoli 12 m nad nivojem ceste in reke. Tam blesteča krvomočnica

porašča kamnito grobljo, veliko okoli 5 m x 5 m in visoko okoli 1.5 m (slika 3). To je odlagališče skal in kamenja, ki je nastalo ob pripravi in vzdrževanju okoliških površin za kmetijsko rabo (čiščenje travnikov kamenja in skal). Takšne groblje so v Trenti pogoste in so poleg suhozidov okoli kmetijskih površin zanimiva kulturna dediščina doline. Rastišče je zelo kamnito, suho in delno sončno, kolikor ozka dolina to dopušča (osončenje približno uro in pol pozimi in pet ur poleti). Talni tip je litosol. Vrstna sestava te kamnite groblje je v popisu št. 3 v preglednici 1. Največje srednje zastiranje na njej imajo poleg blesteče krvomočnice vrste *Sedum sarmentosum* (subspontano uspevanje), *Helictotrichon pubescens*, *Asplenium ruta-muraria*, *Moehringia muscosa*, *Cardaminopsis arenosa*, *Geranium robertianum* ter mahovi *Climacium dendroides*, *Homalothecium lutescens* in *Rhytidiadelphus triquetrus*.

Tretje nahajališče je tik ob hiši, na strmi brežini rečne terase, ki se spušča k cesti in reki (slika 4). Prevladuje travnišče na plitvih peščenih tleh, ki je deloma v senci krošnje velike lipe. Skupna površina je približno 12 m x 12 m. Tu smo naredili dva fitocenološka popisa. Popis št. 2 v preglednici 1 ponazarja ruderalizirano travnišče na brežini, kjer imajo poleg blesteče krvomočnice največje srednje zastiranje vrste *Helictotrichon pubescens*, *Dactylis glomerata*, *Galium mollugo*, *Arrhenatherum elatius*, *Veronica chamaedrys*, *Ranunculus acris*, *Silene vulgaris*, *Geranium robertianum*, *Carex muricata* in *Myosotis sylvatica* agg.

Blesteča krvomočnica je rasla tudi v majhni opuščeni okrasni gredici na vrhu tega pobočja (površina okoli 2 m x 0.3 m) v družbi z nekaj vrtnimi vrstami in tudi priseljenkami iz okoliških združb (popis št. 4 v preglednici 1). Večje zastiranje v tej opuščeni gredici sta imeli še vrsti *Sedum sarmentosum* in *Cardaminopsis arenosa*.

Po floristični podobnosti sta si najbolj podobna popisa ruderaliziranega travnišča pod cesto in nad cesto (preglednica 1). Združba na groblji je nekoliko posebna, v njej v zeliščni plasti prevladujeta dve vrsti, *Geranium lucidum* in *Sedum sarmentosum*. Slednja je okrasna rastlina, doma iz vzhodne Azije in v Sloveniji pogosto podivja po zidovih in skalovju (vir baza FloVegSi). Na groblji je tudi bujna mahovna plast z vrstami *Climacium dendroides*, *Homalothecium lutescens* in *Rhytidiadelphus triquetrus*.

Vsa tri opisana mikrorastišča v nekaterih lastnostih ustrezajo potrebam blesteče krvomočnice. Tla v okolici domačije so bogata s hranili oz. dušikom. Domačija je še do začetka osemdesetih let prejšnjega stoletja premogla do dve kravi in nekaj ovac in koz. Travnike so gnojili s hlevskim gnojem. Ustrezajo tudi bazična tla. Glede sestave tal (Ca/Si) in potrebe po

vlagi obravnavana vrsta ni zahtevna (AESCHIMANN et al. 2004). Obilne padavine v Trenti (2500–3000 mm/leto) močno presegajo mediteransko povprečje in povprečna letna temperatura 6°C – 8°C je precej nižja. Vendar ne eno ne drugo ni zunaj zanjo ugotovljenih rastiščnih parametrov (ANONIMOUS 2013). Ko so pripravljali model invazivnosti te vrste (Weed risk assessment), so upoštevali vsa znana nahajališča predpostavili razpon povprečnih padavin od 400 mm/leto (Španija, Izrael) do več kot 2500 mm/leto (Velika Britanija). Glede odpornosti proti mrazu vrsto postavljajo v 6. odpornostni pas (Plant cold hardiness zones), kar pomeni, da prenese ekstremno minimalno zimsko temperaturo do -23 °C. Naravna naselitev v Trenti bi bila glede na našete okoljske dejavnike mogoča.

Kljub temu uspevanje te vrste v okolici domačije Soča 46 v spodnjem delu doline Trente verjetno ni spontano, saj so za zdaj ugotovljena tamkajšnja rastišča vsa bolj ali manj ruderalna v primerjavi z naravnimi nahajališči, kjer smo to vrsto našli v Trnovskem gozdu (Podrta gora, Sortež in Sv. Duh nad Podkrajem). Najbližja nahajališčem v Trenti so sicer nahajališča pri vasi Čarni Varh / Črni Vrh / Montefosca v Slovenski Benečiji (severovzhodna Italija).

3.4 Možni načini vnosa blesteče krvomočnice v dolino zgornje Soče

Če predpostavimo, da je novo nahajališče drugotno, torej da se je blesteča krvomočnica na njem naselila v novjšem času, lahko razmišljamo o možnih načinih vnosa.

Blesteča krvomočnica (slika 5) je enoletnica ali (zimska) dvoletnica in se razširja z aktivnim izmetavanjem svojih semen do razdalje okoli 6 m z eksplozivnim odvitjem enosemenskih merikarpov (AEDO 2000). Možne načine razširjanja na večje razdalje so preučili v ZDA (ANONIMOUS 2013). Ugotavljajo, da razširjanje semen z vetrom, vodo in ptiči na večje razdalje ni mogoče. Na podlagi študije geografskega vzorca hitre širitve v ZDA so najbolj verjetni povzročitelji razširjanja te vrste na večje razdalje živali in ljudje. Domnevno prevladuje širjenje z divjadjo in domačimi živalmi. Ali gre za notranji ali zunanji prenos ni raziskano. Med verjetnejše načine razširjanja na večje razdalje štejejo še trgovanje z vrtnarskimi rastlinami in semeni kmetijskih rastlin (SALISBURY 1961). Možen je tudi prenos preko prometa, z avtomobilskimi zračnicami. Uspešnost razširjanja povečuje večletna kaljivost semen.

Verjetnost, da bi obravnavano vrsto v Trento prinesla divjad, se zdi precejšna. Zračna razdalja od zdaj

znanih najbližjih naravnih nahajališč v Beneški Sloveniji do Spodnje Trente je približno 26 km. Ta razdalja po podatkih iz literature (LESKOVIC & PIČULIN 2012), po informacijah dobljenih na Zvezi lovskih družin Zgornjega Posočja (MOZETIČ, in litt.) in v osebni pogovoru (OCVIRK, in litt.) za jelene nikakor ne predstavlja večje ovire, še posebej ne v času raka. V območju njenih najbližjih nahajališč in severno od njih, v Breginjskem kotu, je jelenjad pogosta. Lovci štejejo to območje za pomembno žarišče razširjanja jelenjadi, ki ga v Sloveniji opažamo zadnja desetletja. V prid temu načinu vnosa semen govori tudi dejstvo, da je divjad v okolici domačije Martin, ki že dve desetletji ni več stalno naseljena in stoji na samem, zelo pogosta. Lastnika domačije (KRAVANJA, in litt.) sta imela pogosto težave z divjadjo, predvsem z jeleni. Ti so s strmega travišča med domačijo in cesto ob številnih prehodih prožili skale in kamenje na cesto. Zaradi varnosti cestnega prometa je lastnik pobočje pred nekaj leti prekril z žično mrežo. K številčnosti prehodov na lokaciji gotovo prispeva tudi topografija. Dolina Trente je na tem odseku zelo ozka, s strmimi pobočji na obeh straneh.

Med antropogenimi načini vnosa namerna zasadev ne pride v poštev, saj je rastlina vrtnarsko nezanimiva in jo štejejo za plevel. Oba lastnika domačije prinesenih primerkov blesteče krvomočnice nista prepoznala. Poimenovala sta jih »plevel« oziroma sta jih zamenjala s podobno smrdljivo (*Geranium robertianum*), ki je v okolici domačije kot tudi v Bovcu pogosta. Zanesljivo blesteče krvomočnice nista nikoli sadila ali gojila kot lončnico (KRAVANJA, in litt.). Namerni vnos je torej izključen.

Bolj verjeten je nenamern vnos semen v zemlji kupljenih hortikulturnih rastlin, s katerimi domačini krasijo svoje skromne vrtičke. O tem priča manjša gredica z nekaj vrtnarskimi rastlinami na vrhu pobočja med domačijo in cesto. V to gredico sta lastnika v okviru vzdrževanja domačije občasno sadila okrasne rastline tudi po odselitvi. V ZDA izrecno navajajo primere lokalne kontaminacije parkovnih površin in vrtarij s to vrsto (ANONIMOUS 2013). Tudi v Veliki Britaniji navajajo njeno pojavljanje v vrtovih in na ruderalnih površinah (ANONIMOUS 2016). Če je bila blesteča krvomočnica dejansko prinesena v Trento na ta način, mora biti priselitev mlajša, saj navada kupovanja vrtnih okrasnih rastlin tukaj zagotovo ni stara. Nedavno priselitev pa ne podpira dejstvo, da je bilo vnašanje kupljenih rastlin v okolico domačije le občasno in v zelo majhnem obsegu. Vprašanje je, ali se v kratkem času ta

vrsta lahko razširi na takšno površino, kot jo kaže stanje v letu 2016.

Vnos vrste med prvo svetovno vojno je še ena od možnosti. Le okoli 20 m stran od nahajališča med cesto in Sočo je potekala vojaška žičnica Vršič–Lepena/Kršovec (ANONIMUS, 1918), ki je oskrbovala Avstro-Ogrske vojaške baze v Lepeni, pri Krnskih jezerih in na planini Golobar, ki so podpirale celotno frontno črto od Krna do Bovca. Po njej so morali prepeljati velike količine sena za številne tovarne živali, ki so bile v teh gorah ključno transportno sredstvo. Gotovo se ga je nekaj izgubilo med prevozom po žičnici, morda tudi pri zdajšnjem nahajališču blesteče krvomočnice. Težko pa si je razložiti prisotnost semen blesteče krvomočnice v senu, saj njena naravna nahajališča niso na travnikih.

Vnos semen z gradivom pri gradnji oziroma kasneje pri obnovitvenih delih in vzdrževanju ceste Bovec–Vršič je še ena od možnosti. Kljub temu, da smo prvo mikrolokacijo našli tik ob cesti, pa se zdi, vsaj v zadnjih nekaj desetletjih, ta možnost zelo malo verjetna. Kljub iskanju te vrste nizvodno in ob teku Soče navzgor proti Trenti je na drugih podobnih mestih ob cesti nismo opazili. Tudi nahajališči na pobočju in groblji pri domačiji sta precej nad ravno ceste, kar ne govori v prid tej možnosti. Še pomembnejši razlog, ki govori proti tej možnosti vnosa se zdi izvor gradiva (peska, gramoza, kamenja), ki ga Cestno podjetje Nova Gorica, ki že desetletja vzdržuje vršiško cesto, uporablja pri vzdrževalnih in manjših investicijskih delih na tej cesti. Po podatkih, ki smo jih dobili pri njih (MELINC, in litt.), izvira vse gradivo, ki ga uporabljajo pri teh delih iz dveh njihovih najbližjih cestnih baz v Bovcu in pri Tolminu, torej iz območij, kjer blesteča krvomočnica po zdaj znanih podatkih ne raste. Možnost vnosa gradiva iz območij, kjer je vrsta naravno prisotna obstaja le pri večjih investicijskih delih, ki jih lahko izvajajo tudi drugi izvajalci. Pri teh je izvor uporabljenih gradiv težje sledljiv. Vendar na odseku novega nahajališča takih del ni bilo.

Ugotavljamo, da je za zdaj populacija blesteče krvomočnice v okolici domačije Martin, Soča 46, obilna in vitalna in se bo najbrž ohranila, morda celo širila. Mogoča je tudi njena drugačna prihodnost v Trenti. Po drugi svetovni vojni (med letoma 1945 in 1960) so jo namreč nasadili tudi v Alpskem botaničnem vrtu Julijana, a se tam ni ohranila. V seznamu Cirila Jegliča, ki obsega rastline v vrtu iz leta 1963, in v kasnejših seznamih te vrste ni več (PRAPROTNIK 2012).

4 ZAKLJUČKI

Vrsto *Geranium lucidum* v Sloveniji poznamo predvsem na zelo kamnitih ali skalnatih in razmeroma vlažnih rastiščih, na meliščih in v listnatih gozdovih, predvsem v submediteranskem in deloma dinarskem fitogeografskem območju. Na takšnih rastiščih smo jo našli tudi v Trnovskem gozdu (Podrta gora, Sortež, Sv. Duh nad Podkrajem).

Precej drugačna so rastišča na novem nahajališču v Spodnji Trenti, ki je do zdaj prvo v slovenskem delu Julijskih Alp (v italijanskem delu jo poznajo v njihovem prigorju v Slovenski Benečiji). V Trenti (na robu vasi Soča) ta vrsta namreč raste na kamnitih travnikih in brežinah in na kamnitih grobljah, na rastiščih s plit-

vimi tlemi, ki so ponekod bogata z dušikom, a jih je tako ali drugače (pre)oblikoval človek. Za zdaj ta nova nahajališča obravnavamo kot drugotna. Najverjetnejši način vnosa se zdi z divjadjo (jelenjadjo), manj verjeten je vnos blesteče krvomočnice z mešanicami zemlje okrasnih rastlin. Malo verjetna sta vnosa z gradivom (peskom, gramozom, kamenjem) pri vzdrževanju ceste, ob kateri smo jo najprej našli, ali s krmo za konje v prvi svetovni vojni. Nameren vnos izključujemo. Očitno pa ji rastiščne razmere ustrezajo in je populacija vitalna in številčna. Možnosti, da ta krvomočnica v Trenti uspeva tudi v naravnih združbah, ne moremo izključiti.

5 SUMMARY

In the paper we are describing new localities of *Geranium lucidum* L. in the Trnovski Gozd Plateau in Dinaric phytogeographical region and in the Trenta Valley, in the Julian Alps in Alpine phytogeographical region of Slovenia. The latter is quite surprising find and most probably secondary (subspontaneous). Eventual ways (means) of introduction of the plant to this locality, which is quite distant to already known ones, are discussed.

Geranium lucidum is usually considered as a Mediterranean or Mediterranean-Sub-Atlantic species. However, it can be found also elsewhere in Europe, like in Great Britain, Germany, Sweden and Norway and also in Middle East, Caucasus and parts of the Himalaya (AEDO et al. 1998). Also its valence to different habitat parameters is much wider than valid in the Mediterranean region (ANONYMOUS 2013).

The species is introduced to United States, Canada, Australia and New Zealand. In United States it is considered an important invasive species. From 1971, when it was first observed, it has been spreading rapidly. It endangers particularly natural communities of open and riparian forests of valuable broad-leaved tree species (DENNEHY et al. 2011, ANONYMOUS 2013). Much of research on spreading of this species has been done by United States Department of Agriculture (USDA) (ANONYMOUS 2013).

In the Alps, the species occurs rather scattered, mainly in their west most and southwest most parts, and partly also in some regions of Southern and South-eastern Alps in the provinces Verona, Brescia, Bergamo and Udine in Italy (AESCHIMANN et al. 2004). In Slovenia it inhabits almost exclusively its southwestern

part in sub-Mediterranean and only partly also Dinaric phytogeographical regions (Fig. 1). Localities in the Alpine phytogeographical region have not been known up to now (JOGAN et al. 2001, PLAZAR 2001, AESCHIMANN et al. 2004, MARTINČIČ 2007). The closest known, quite recent localities to Slovenian part of the Julian Alps are in the Julian Pre-Alps in the Natisone Valley in NE Italy (Montefosca/Čarni Varh, Vogu), south from Robidišče, very close to Slovenian-Italian border (POLDINI 2002, MARTINI, 2016, in litt.).

Floristic records and relevés on the sites of *Geranium lucidum* in the Trenta Valley have been made using standard Central European methods (EHRENDORFER & HAMANN 1965, JALAS & SUOMINEN 1967, BRAUN-BLANQUET 1964). Data were entered into the FloVegSi database (SELIŠKAR et al. 2003) and compared using hierarchical classification. Details of the new localities are given in the chapter 3.1 of Slovenian text and in Table 1.

New localities of *Geranium lucidum* in the Trnovski Gozd Plateau are situated in rocky and stony environment in montane and altimontane belt. Under Podrta gora it thrives on coarse scree slopes and in pioneer open forests, dominating by *Ostrya carpinifolia*; at Predmeja (Sortež) and at Podkraj (Sv. Duh) it grows on rocky sites in beech stands of the association *Isopyro-Fagetum*. It was found in similar rocky sites also in Čičarija (*Lamio orvalae-Fagetum pseudofumarietosum albae*).

New locality in the Trenta Valley consists of three micro-localities all within a perimeter of about 100 m.

The first micro-locality (Fig. 2) is a narrow band of partly ruderal land measuring about 3 m by 35 m be-

tween regional road Bovec–Vršič and Soča river bed. The parent material mostly consists of gravel. Soil type is rendzina. The grassland is mostly in shade with high ground and air humidity. Other more abundant species are *Arrhenatherum elatius*, *Ranunculus acris*, *R. repens*, *Ajuga genevensis*, *Parietaria officinalis*, *Petasites paradoxus*, *Fragaria vesca* and *Rubus caesius*. Details are given in Relevé 1, Table 1.

The second and the third micro-locality are about 12 m higher than the first one. They are situated on a narrow alluvial terrace very close to uninhabited farm house Martin, Soča 46. On the second micro-locality (Fig. 3) *Geranium lucidum* grows on a partly overgrown heap of rocks. The heap consists of rocks and stones collected by man during establishing and maintaining of nearby grassland. Such heaps are a common agricultural heritage in the Trenta Valley. The place is very stony, dry and only partly sunny because of very narrow valley. Soil type is lithosol. More abundant species apart of *Geranium lucidum* are *Sedum sarmentosum* (subspontaneous), *Helictotrichon pubescens*, *Asplenium ruta-muraria*, *Moehringia muscosa*, *Cardaminopsis arenosa*, *Geranium robertianum* and mosses: *Climacium dendroides*, *Homalothecium lutescens* and *Rhytidiadelphus triquetrus*. Details are in Relevé 3, Table 1.

The third micro-locality (Fig. 4) is next to the farmhouse on a steep side slope of the alluvial terrace, which descends down to the road and the river. It represents grassland on shallow, sandy soils, partly in shade of a large tree of *Tilia platyphyllos*. The piece of land measures about 12 m x 12 m. The Relevé 2, Table 1, illustrates semiruderal grassland on the steep slope. Most abundant species apart of *Geranium lucidum* are *Helictotrichon pubescens*, *Dactylis glomerata*, *Galium mollugo*, *Arrhenatherum elatius*, *Veronica chamaedrys*, *Ranunculus acris*, *Silene vulgaris*, *Geranium robertianum*, *Carex muricata* and *Myosotis sylvatica* agg.

Base- and nitrogen rich soils due to past stock farming and fertilization with stable manure, average temperatures 6 °C – 8 °C, lowest temperatures and annual precipitations 2500–3000 mm/year at the locality do not correspond to (sub)Mediterranean climate. However, if we consider environmental parameters of all known sites and localities where *Geranium lucidum* has been found neither temperatures nor precipitations at the site fall outside the range taken into account in the weed risk assessment of this species made in US (ANONIMOUS 2013). From the aspect of these habitat parameters a spontaneous growth of *Geranium lucidum* in the Trenta Valley seems possible. Nevertheless, we still consider the locality as secondary or subspontaneous. All three known micro-localities are in more or less ruderal sites, close to a farmhouse. This

apparently stands in a too sharp contrast to spontaneous localities found in the Trnovski Gozd Plateau and elsewhere.

Assuming secondary (subspontaneous) origin of the plant in the Trenta Valley a question arises: how the plant was introduced? We can't give a definitive answer. But, taking into account the study of its spreading in US (ANONIMOUS 2013, DENNEHY et al. 2011) and local conditions, we can at least discuss the most probable options.

USDA's study *Weed Risk Assessment for Geranium lucidum* (ANONIMOUS 2013) maintains spreading of the plant on long distances by large mammal game and domestic animals as the most probable. This seems true also at the Trenta Valley locality where red-deer (*Cervus elaphus*) represents the most important agent. The line of sight distance to the nearest known localities of *Geranium lucidum* in the Julian Pre-Alps in Italy is about 26 km. Such distances do not pose a problem for migration of red-deer, particularly not during rutting period. The closest localities in NE Italy (Montefosca/Čarni Varh) and in the region just north of them (Breginjski kot) are known for large populations of red-deer and considered by some hunters an important focal point of red deer spreading, which populations are significantly increasing during last decades in Slovenia. The owners of the farmhouse Martin have had frequent problems with red-deer, which passes their property and set off rocks and stones, which land on the road. To prevent eventual traffic accidents the owner covered the steep slope next to his farmhouse with iron mesh a few years ago. Also topography of the Trenta Valley at the location certainly increases number of passages of the game. The valley is very narrow here having steep mountain slopes on both sides.

Among anthropogenic causes a direct intentional introduction seems highly improbable. The plant has no horticultural value and is rather considered a weed. The owners of the farmhouse did not recognize the plant shown to them and also considered it as a 'weed', actually confused it with *Geranium robertianum*, which is common at the new localities. They explicitly stated they have never planted it.

Spreading of *Geranium lucidum* on long distances by seed contaminated soil of purchased horticultural plants is known from literature (ANONIMOUS 2016) and considered quite probable. The owners of the farmhouse Martin have been also buying occasionally horticultural plants to modestly decorate their home, however very rarely. We found a small abandoned flower bed near the farmhouse with a few horticultural plants where *Geranium lucidum* was also present. Nevertheless, the probability of introduction of it in

this way still seems small. On one hand buying horticultural plants was almost unknown practice in the Trenta Valley a decade or two ago. Also, number of planted horticultural plants during last 20 years when the farmhouse has not been inhabited anymore (owners moved to town Bovec) was very small.

Cases of introduction of non-autochthon plants by hay needed to feed army animals supporting (for long time periods unchanging) front lines during the First World War are known in Slovenia. Only 20 m away of the first new micro-locality of *Geranium lucidum* operated an Austro-Hungarian army cable car connecting Vršič pass with the front lines from Krn Mountains to Bovec. Tons and tons of hay had to be transported to feed numerous mules and horses for almost two years. They were the only transport mean in these high-mountain front lines. Some of it was certainly lost during transport. However, it is difficult to imagine how could *Geranium lucidum* seeds come into the hay. Moved grassland is not its site. Therefore we consider this option of introduction improbable.

Since the first micro-locality of *Geranium lucidum* is located directly next to the road, maintaining of the road as a mean of plant introduction was also considered. But we estimate also this probability low, mainly due to the following two facts. First, the find next to the road seems to be unique. We inspected the road

up- and downstream of the river for quite a distance, but we didn't find any other occurrences of it. Second, the company, which has been maintaining the road for decades uses road maintaining materials (gravel, clay, etc.), which origins from two places in the upper Soča River region, where *Geranium lucidum* doesn't grow. The only possibility to introduce the seeds this way would exist during larger reconstruction works, which could be operated by other road maintaining companies. In this case the origin of the materials used can be elsewhere including from regions where *Geranium lucidum* is presented. But there have been no such works at this section of the road.

The population of *Geranium lucidum* in the Trenta Valley near the farmhouse Martin, Soča 46, is presently vital and numerous. Well above 100 flowering plants were found during our research. It appears stable, so it will probably remain such in future, eventually it may even spread. Also, we cannot exclude with certainty the possibility that new localities will be found in future, even on natural sites. But also opposite scenario cannot be excluded. The plant was intentionally introduced into Alpine Botanical Garden Juliana about 7 km upstream of river Soča in sixties of last century. However, the species disappeared from the lists of plants cultivated in the garden from 1963 on (PRAPROTNIK 2012).

ZAHVALA

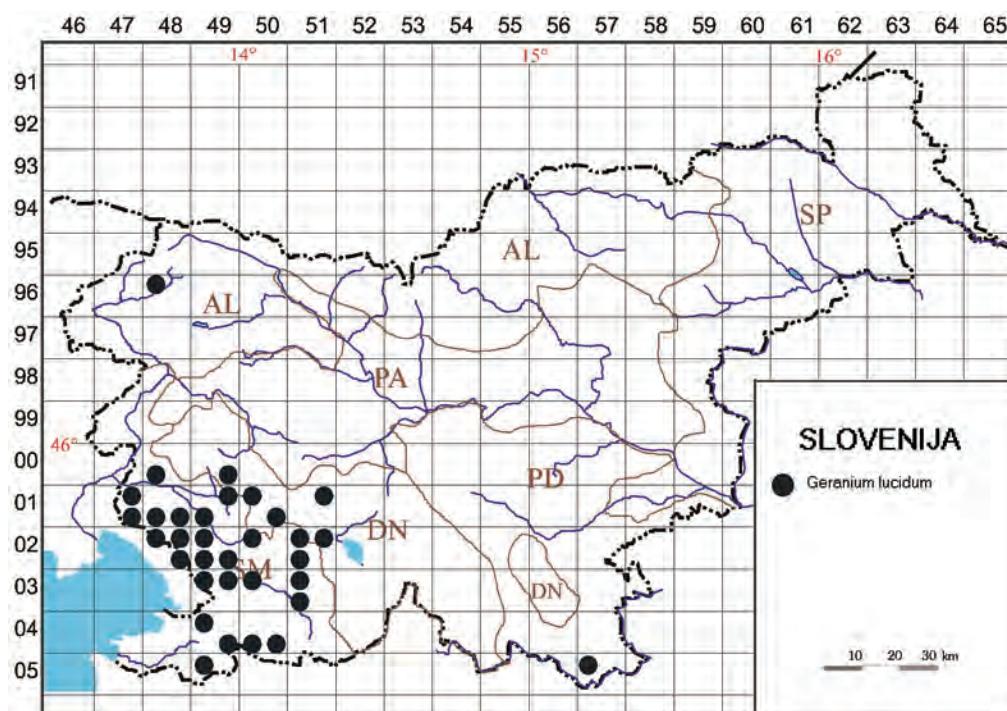
Lepo se zahvaljujema dr. Branku Vrešu za možnost uporabe podatkovne baze FloVegSi pri pripravi arealne karte blesteče krvomočnice in doc. dr. Tinki Bačič za podatke o razširjenosti te vrste v Sloveniji, ki se nahajajo v bazi Centra za kartografijo favne in flore (CKFF). Prof. dr. Fabrizio Martini (Trst/Trieste) nama je prijazno posredoval podatke o nahajališčih obravnavane vrste pri vasi Čarni Varh/Montefosca v Beneški Sloveniji. Akademik dr. Mitja Zupančič in prof. dr. Franc Batič ste opravila strokovni pregled besedila, pri čemer nam je slednji opozoril tudi na nahajališče obravna-

vane vrste pri Logatcu. Zahvaljujema se zakonskemu paru Francu in Jožici Kravanja (Bovec) za dovoljenje za botaniziranje na njuni posesti pri Martinu in za ostale podatke. Hvala tudi Jerneju Peljhanu za posredovanje fitocenoloških popisov združb, v katerih uspeva ta vrsta v Griži pod Podrto goro in Fedji Klavora, ki nam je posredoval vojaški zemljevid s traso tovarne žičnice iz prve svetovne vojne. Zahvaljujema se tudi lovcema Mileni Ocvirk in Aljoši Mozetiču za oceno selitvenih lastnosti jelenjadi in Beti Melinc za podatke o načinu vzdrževanja ceste Bovec-Vršič.

LITERATURA- REFERENCES

- AEDO, C., F. M. GARMENDIA & F. PANDO, 1998: *World checklist of Geranium L. (Geraniaceae)*. Anales del Jardín Botánico de Madrid (Madrid) 56 (2): 211–252. (citirano v Anonymous 2013).
- AEDO, C., 2000: *The genus Geranium L. (Geraniaceae) in North America*, I. *Annual Species*, Anales Jardín Botánico de Madrid (Madrid) 58 (1): 39–82. (dosegljivo na [http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/2000/Anales_58\(1\)_039_082.pdf](http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/2000/Anales_58(1)_039_082.pdf) – (13.06. 2016).

- AESCHIMANN, D. K., K. LAUBER, D. M. MOSER & J.-P. THEURILLAT, 2004: *Flora alpina*. Band 1., Haupt, 1159 pp.
- ANONYMOUS, cca 1918: *Vojaški zemljevid trase tovarne žičnice Vršič – Kršovec*. Vojni muzej, Dunaj.
- ANONYMOUS, 2013: *Weed Risk Assessment for Geranium lucidum L. (Geraniaceae)*. Shinig Cranesbill, United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Raleigh, NC, 17 pp. (dosegljivo na https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/weeds/downloads/wra/Geranium_lucidum_WRA.pdf (13.6. 2016))
- ANONIMOUS 2016: *Online Atlas of the British & Irish Flora*. <http://www.brc.ac.uk/plantatlas/index.php?q=node/3394> (13.6.2016).
- BLAMEY, M. & C. GRAY-WILSON, 2004: *Wild Flowers of the Mediterranean*. A & C Black, London.
- BRAUN-BLANQUET, J., 1964: *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde*. 3. Auf., Springer Verlag, Wien–New York.
- DAKSKOBLER, I., 2014: *Phytosociological description of altimontane beech forest on the southeastern edge of the Trnovski gozd and Nanos plateaus (southwestern Slovenia)*. Folia biologica et geologica (Ljubljana) 55 (2): 5–59.
- DAKSKOBLER, I. & M. REŠČIČ, 2015: *Fitocenološka in gozdnogospodarska analiza gorskega bukovega in javorovega gozda na skalnatih rastiščih na Krasu in v Čičariji (JZ Slovenija)*. Gozdarski vestnik (Ljubljana) 73 (2): 67–87.
- DENNEHY, C., E. R. ALVERSON, H. E. ANDERSON, D. R. CLEMENTS, R. GILBERT & T. N. KAYE, 2011: *Management Strategies for Invasive Plants in Pacific Northwest Prairies, Savannas, and Oak Woodlands*. Northwest Science, 85 (2): 329–351.
- EHRENDORFER, F. & U. HAMANN, 1965: *Vorschläge zu einer floristischen Kartierung von Mitteleuropa*. Ber. Deutsch. Bot. Ges. (Berlin-Stuttgart) 78: 35–50.
- FISCHER M. A., W. ADLER & K. OSWALD, 2005: *Exkursionsflora von Österreich, Liechtenstein und Südtirol*. Land Oberösterreich, Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen, Linz.
- JALAS, J. & J. SUOMINEN, 1967: *Mapping the distribution of European vascular plants*. Memoranda Soc. pro Fauna Flora Fennica (Helsinki) 43: 60–72.
- JOGAN, N., T. BAČIČ, B. FRAJMAN, I. LESKOVAR, D. NAGLIČ, A. PODOBNIK, B. ROZMAN, S. STRGULC-KRAJŠEK & B. TRČAK, 2001: *Gradivo za Atlas flore Slovenije*. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju.
- JURJEVČIČ, B., 2004: *Naravovarstveni pomen udornic na območju Logatca*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij varstva naravne dediščine. (Magistrsko delo, 114 pp.).
- LAUBER, K., G. WAGNER & A. GYGAX, 2012: *Flora Helvetica*. 5. Auflage, Bern - Stuttgart - Wien, Haupt.
- LESKOVIC, B. & I. PIČULIN (ur.), 2012: *Divjad in lovstvo*. Lovska zveza Slovenije, Ljubljana.
- MARTINČIČ, A., 2007: *Geraniaceae – krvomočnikovke*. In: A. Martinčič (ed.): *Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk*. Tehniška založba Slovenije, četrta, dopolnjena in spremenjena izdaja, Ljubljana. pp. 347–352.
- MARTINČIČ, A., T. WRABER, N. JOGAN, A. PODOBNIK, B. TURK, B. VREŠ, V. RAVNIK, B. FRAJMAN, S. STRGULC-KRAJŠEK, B. TRČAK, T. BAČIČ, M. A. FISCHER, K. ELER & B. SURINA, 2007: *Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk*. Četrta, dopolnjena in spremenjena izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana.
- PLAZAR, J., 2001: *Rod krvomočnic (Geranium) v Sloveniji*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (Diplomska naloga, 176 pp.)
- PODANI, J., 2001: SYN-TAX 2000. *Computer Programs for Data Analysis in Ecology and Systematics*. User's Manual, Budapest.
- POLDINI, L., 1991: *Atlante corologico delle piante vascolari nel Friuli-Venezia Giulia. Inventario floristico regionale*. Regione Autonoma Friuli-Venezia Giulia & Università degli studi di Trieste, Dipartimento di Biologia, Udine.
- POLDINI, L. v sodelovanju z G. ORIOLO & M. VIDALI, 2002: *Nuovo Atlante corologico delle piante vascolari nel Friuli Venezia Giulia*. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Azienda Parchi e Foreste Regionali & Università degli Studi di Trieste, Dipartimento di Biologia, Udine.
- PRAPROTNIK, N., 2012: *Alpski botanični vrt Juliana in seznam rastlin*. Scopolia (Ljubljana) 75: 1–111.
- SALISBURY, E., 1961: *Weeds and Aliens*. Collins, London. (citirano v Anonymous 2013).
- SCHONFELDER I. & P., 2002: *Kosmos Atlas Mittelmeer- und Kanarenflora*. Kosmos, Stuttgart.
- SELIŠKAR, T., B. VREŠ & A. SELIŠKAR, 2003: *FloVegSi 2.0. Računalniški program za urejanje in analizo bioloških podatkov*. Biološki inštitut ZRC SAZU, Ljubljana.
- ŠILC, U. & A. ČARNI, 2012: *Conspectus of vegetation syntaxa in Slovenia*. Hacquetia (Ljubljana) 11 (1): 113–164.
- THEURILLAT J.-P., 2004: *Pflanzensoziologisches System*. In: Aeschimann, D., K. Lauber, D. M. Moser & J. P. Theurillat: *Flora Alpina 3: Register*. Haupt Verlag, Bern, Stuttgart, Wien pp. 301–313.



Slika 1: Razširjenost blesteče krvomočnice (*Geranium lucidum*) v Sloveniji (vir: podatkovna baza FloVegSi)
 Figure 1: Distribution of *Geranium lucidum* in Slovenia (source: the FloVegSi database)



Slika 2: Pogled na prvo mikrorastišče, ruderalizirano travišče med cesto Bovec–Vršič in reko Sočo pri domačiji Martin, Soča 46 v približni izmeri 3 m x 35 m. Foto: A. Trnkoczy.
 Figure 2: A view on the first micro-locality, ruderalized grassland between the regional road Bovec–Vršič and the river Soča near farmhouse Martin, Soča 46, measuring about 3 m x 35 m. Photo: A. Trnkoczy



Slika 3: Pogled na drugo mikrorastišče, obraslo grobljo iz skal in kamena, ki je nastala s človekovim delovanjem, pri osnovanju in čiščenju travnišč. Foto: A. Trnkoczy
 Figure 3: A view on the second micro-locality, a heap of stones and rocks collected by man during establishment and cleaning of neighboring agricultural land. Photo: A. Trnkoczy



Slika 4: Pogled na tretje mikrorastišče, strmo travnato pobočje med robom rečne terase in cesto oziroma reko. Foto: A. Trnkoczy
 Figure 4: A view on the third micro-locality consisting of a steep grassy slope descending from the edge of the alluvial terrace down to the road and the river bed. Photo: A. Trnkoczy



Slika 5: Blesteča krvomočnica (*Geranium lucidum*) - cvet in listi. Foto: A. Trnkoczy

Figure 5: *Geranium lucidum* - a flower and leaves. Photo: A. Trnkoczy



Slika 6: Blesteča krvomočnica (*Geranium lucidum*) z značilnimi prečno rebrastimi plodovi (glavica s kljuncem).

Foto: A. Trnkoczy

Figure 6: *Geranium lucidum* with characteristic transversally ribbed fruits (capsule with beak). Photo: A. Trnkoczy

Preglednica 1: Združbe z vrsto *Geranium lucidum* v dolini Trente
Table 1: Communities with *Geranium lucidum* in the Trenta Valley

Zaporedna številka popisa (Number of relevé)		1	2	3	4			
Delovna številka popisa (Database number of relevé)		261740	261762	261760	261761			
Nadmorska višina v m (Elevation in m)		510	520	525	521			
Lega (Aspect)		SE	SE	SEE	SE			
Nagib v stopinjah (Slope in degrees)		25	30	20	10			
Matična podlaga (Parent material)		Gr	Gr	Gr	Gr			
Tla (Soil)		Re	Re	Li	Li			
Kamnitost v % (Stoniness in %)		5	5	100	5			
Zastiranje v % (Cover in %):								
Zeliščna plast (Herb layer)		E1	90	90	60	70		
Mahovna plast (Moss layer)		E0	.	.	80	.		
Število vrst (Number of species)			54	32	34	14		
Velikost popisne ploskve (Relevé area)		m²	20	20	20	1		
Datum popisa (Date of taking relevé)			5/26/2016	5/26/2016	5/26/2016	5/26/2016		
Nahajališče (Locality)			Soča - Martin	Soča - Martin	Soča - Martin	Soča - Martin		
Kvadrant (Quadrant)			9648/1	9648/1	9648/1	9648/1		
Koordinate (Coordinate) GK Y (D-48)		m	399806	399782	399739	399783		
Koordinate (Coordinate) GK X (D-48)		m	5134948	5134949	5134955	5134941		
MA	<i>Molinio-Arrhenatheretea</i>						Pr. Fr.	
	<i>Galium mollugo</i>	E1	+	1	+	.	3 75	
	<i>Veronica chamaedrys</i>	E1	+	1	+	.	3 75	
	<i>Rumex acetosa</i>	E1	+	+	+	.	3 75	
	<i>Arrhenatherum elatius</i>	E1	2	1	.	.	2 50	
	<i>Ranunculus acris</i>	E1	1	1	.	.	2 50	
	<i>Dactylis glomerata</i>	E1	+	1	.	.	2 50	
	<i>Poa pratensis</i>	E1	+	1	.	.	2 50	
	<i>Cerastium holosteoides</i>	E1	+	.	.	+	2 50	
	<i>Helictotrichon pubescens</i>	E1	.	2	2	.	2 50	
	<i>Ranunculus repens</i>	E1	1	.	.	.	1 25	
	<i>Plantago lanceolata</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Plantago major</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Achillea millefolium</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Angelica sylvestris</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Taraxacum officinale</i> agg.	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Trifolium pratense</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Vicia sepium</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Anthriscus sylvestris</i>	E1	.	+	.	.	1 25	
	<i>Daucus carota</i>	E1	.	.	+	.	1 25	
	<i>Lathyrus pratensis</i>	E1	.	.	+	.	1 25	
FB	<i>Festuco-Brometea</i>							
	<i>Medicago lupulina</i>	E1	+	+	.	+	3 75	
	<i>Pimpinella saxifraga</i>	E1	.	+	+	+	3 75	
	<i>Silene vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	E1	+	1	.	.	2 50	
	<i>Ajuga genevensis</i>	E1	1	.	+	.	2 50	
	<i>Brachypodium rupestre</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Euphorbia cyparissias</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Galium lucidum</i>	E1	.	.	.	.	1 25	
	<i>Ranunculus bulbosus</i>	E1	.	+	.	.	1 25	
ES	<i>Elyno-Seslerietea</i>							
	<i>Alchemilla glaucescens</i>	E1	+	.	.	.	1 25	
	<i>Cerastium strictum</i>	E1	+	.	+	.	2 50	
TG	<i>Trifolio-Geranietea</i>							
	<i>Vincetoxicum hirundinaria</i>	E1	+	.	+	.	2 50	

Zaporedna številka popisa (Number of relevé)		1	2	3	4	Pr.	Fr.
	<i>Thalictrum minus</i>	E1	+	.	.	1	25
	<i>Origanum vulgare</i>	E1	.	+	.	1	25
	<i>Lilium bulbiferum</i>	E1	.	.	+	1	25
GA	Geo-Alliarion						
	<i>Geranium lucidum</i>	E1	2	1	3	2	3 75
	<i>Geranium robertianum</i>	E1	+	1	1	.	3 75
GU	Galio-Urticetea						
	<i>Parietaria officinalis</i>	E1	1	+	.	.	2 50
	<i>Aegopodium podagraria</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Salvia verticillata</i>	E1	.	+	.	.	1 25
	<i>Geum urbanum</i>	E1	.	.	+	.	1 25
	<i>Urtica dioica</i>	E1	.	.	+	.	1 25
	<i>Glechoma hederacea</i>	E1	.	.	.	+	1 25
SM	Stellarietea mediae						
	<i>Chelidonium majus</i>	E1	.	+	.	.	1 25
	<i>Erigeron annuus</i>	E1	.	+	.	.	1 25
	<i>Myosotis arvensis</i>	E1	.	.	.	+	1 25
TR	Thlaspietea rotundifolii						
	<i>Petasites paradoxus</i>	E1	2	.	.	.	1 25
	<i>Gymnocarpium robertianum</i>	E1	.	.	+	.	1 25
KC	Koelerio-Corynephoretea						
	<i>Cardaminopsis arenosa</i>	E1	+	.	1	1	3 75
	<i>Sedum acre</i>	E1	.	+	+	.	2 50
	<i>Arenaria serpyllifolia</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Sedum sexangulare</i>	E1	.	+	.	.	1 25
	<i>Sedum album</i>	E1	.	.	+	.	1 25
AT	Asplenietea trichomanis						
	<i>Sedum hispanicum</i>	E1	+	.	+	+	3 75
	<i>Cystopteris fragilis</i>	E1	+	+	.	.	2 50
	<i>Moehringia muscosa</i>	E1	+	.	1	.	2 50
	<i>Asplenium ruta-muraria</i>	E1	.	+	1	.	2 50
	<i>Asplenium trichomanes</i>	E1	.	.	+	.	1 25
	<i>Saxifraga hostii</i>	E1	.	.	.	+	1 25
EA	Epilobietea angustifolii						
	<i>Fragaria vesca</i>	E1	1	+	+	+	4 100
	<i>Carex muricata</i>	E1	+	1	.	.	2 50
	<i>Myosotis sylvatica</i> agg.	E1	.	1	+	.	2 50
MuA	Mulgedio-Aconitetea						
	<i>Aconitum lycoctonum</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Chaerophyllum hirsutum</i>	E1	+	.	.	.	1 25
EP	Erico-Pineteta						
	<i>Carex ornithopoda</i>	E1	r	+	.	.	2 50
	<i>Epipactis atrorubens</i>	E1	+	.	+	.	2 50
FS	Fagetalia sylvaticae						
	<i>Salvia glutinosa</i>	E1	+	+	.	.	2 50
	<i>Galeobdolon flavidum</i>	E1	+	.	+	.	2 50
	<i>Brachypodium sylvaticum</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Campanula trachelium</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Heracleum sphondylium</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Knautia drymeia</i>	E1	+	.	.	.	1 25
	<i>Rhamnus fallax</i>	E2a	.	.	+	.	1 25
	<i>Asarum europaeum</i> subsp. <i>caucasicum</i>	E1	.	.	+	.	1 25
QP	Quercetalia pubescenti-petraeae						
	<i>Primula veris</i> subsp. <i>columnae</i>	E1	+	+	.	.	2 50
QF	Quercu-Fagetea						
	<i>Rubus caesius</i>	E1	2	.	.	.	1 25

Zaporedna številka popisa (Number of relevé)		1	2	3	4	Pr.	Fr.
	<i>Cruciata glabra</i>	E1	+	.	+	.	2 50
	<i>Dactylorhiza fuchsii</i>	E1	r	.	.	.	1 25
	<i>Listera ovata</i>	E1	+	.	.	.	1 25
O	Druge vrste (Other species)						
	<i>Sedum sarmentosum</i>	E1	.	.	3	1	2 50
	<i>Forsythia viridissima</i>	E2a	r	.	.	.	1 25
	<i>Muscari neglectum</i>	E1	.	+	.	.	1 25
	<i>Cerastium tomentosum</i>	E1	.	+	.	.	1 25
	<i>Dianthus</i> sp.	E1	.	.	.	+	1 25
	<i>Lupinus</i> sp.	E1	.	.	.	+	1 25
M	Mahovi (Mosses)						
	<i>Plagiomnium undulatum</i>	E0	+	.	.	.	1 25
	<i>Climacium dendroides</i>	E0	.	.	2	.	1 25
	<i>Homalothecium lutescens</i>	E0	.	.	3	.	1 25
	<i>Rhytidiadelphus triquetrus</i>	E0	.	.	1	.	1 25
	<i>Hypnum cupressiforme</i>	E0	.	.	+	.	1 25

Legenda - Legend

Gr Grušč - Gravel

Re Rendzina - Rendzina

Li Kamnišče - Lithosol

RAZVOJ PATENTIRANEGA BREZPILOTNEGA SISTEMA ZA VZORČENJE IZ DREVESNIH KROŠENJ

DEVELOPMENT OF A PATENTED UNMANNED AERIAL VEHICLE BASED SYSTEM FOR TREE CANOPY SAMPLING

Domen FINŽGAR^{*1}, Marko BAJC¹, Jernej BREZOVAR², Andraž KLADNIK², Rok CAPUDER² in Hojka KRAIGHER¹

Received December 28, 2016; accepted December 29, 2016.
Delo je prispelo 28. decembra 2016, sprejeto 29. decembra 2016.

IZVLEČEK

Razvoj patentiranega brezpilotnega sistema za vzorčenje iz drevesnih krošenj

Potreba po vzorčenju v drevesnih krošnjah je prisotna v številnih panogah znotraj bioloških znanosti, npr. v gozdarstvu, botaniki, fitopatologiji idr. V tem prispevku smo pregledali značilnosti uveljavljenih načinov vzorčenja v drevesnih krošnjah in pregledali stanje tehnike na področju vzorčevalnikov nameščenih na brezpilotnih letalnikih. Predstavili smo patentiran sistem Lucanus za vzorčenje iz drevesnih krošenj z brezpilotnimi letalniki, ki je plod lastnega razvoja, in ga primerjali z uveljavljenimi načini vzorčenja in konkurenčnim sistemom vzorčenja z brezpilotnimi letalniki. Na podlagi primerjave smo ugotovili, da sistem Lucanus in koncept vzorčenja z brezpilotnimi letalniki v veliki meri odpravljata pomanjkljivosti uveljavljenih načinov vzorčenja iz drevesnih krošenj saj je njegova uporaba varnejša za vzorčevalca, vzorčenje je natančno, selektivno in hkrati ne povzroča nepotrebnih poškodb vzorčenih dreves. Ključne pomanjkljivosti sistema Lucanus so zahteva po visoki izurjenosti upravljalca in relativno kratka avtonomija.

Ključne besede: vzorčenje, drevesne krošnje, patent, drone, UAV, robotska roka, daljinsko upravljanje, EUFORINNO

ABSTRACT

Development of a patented unmanned aerial vehicle based system for tree canopy sampling

Collection of samples in tree canopies is a common requirement within a variety of disciplines e.g., forestry, botany, phytopathology, etc. Established approaches to collecting samples in tree canopies and state of the art in the field of sampling in tree canopies with unmanned aerial vehicles (UAVs) were reviewed. A novel and patented UAV based system for sampling in tree canopies, Lucanus, was presented and its capabilities compared to the established sampling approaches and a competitive UAV based system. Based on this comparison it was concluded that Lucanus, and UAV based approach to sampling in tree canopies in general, largely overcomes the shortcomings of the established sampling approaches as it offers greater safety for the operator, increased selectivity and accuracy, and reduces the level of unnecessary damage of the sampled tree. Key shortcomings of the Lucanus system include the requirement for a highly trained operator and a relatively short endurance.

Key words: sampling, patent, tree canopy, drone, UAV, robotic arm, remotely controlled devices, EUFORINNO

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI – 1000 Ljubljana, Slovenija, E-pošta: domen.finzgar@gozdis.si

² Zavod 404, Jamova cesta 80, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

Vzorčenje v nivoju drevesnih krošenj je pogosto uporabljena metoda znotraj področij gozdnega semenarstva, genetike, fiziologije, botanike, fitopatologije, in dendrologije. Takšno vzorčenje se navadno opravi s plezanjem na drevo, posekom drevesa, s katerega želimo odvzeti vzorec, ali z odstrelom veje z drevesa s strelnim orožjem. Pomanjkljivosti takšnih metod je več. Pri plezanju predstavlja težavo predvsem sorazmerno visoka cena najema plezalca in visoka poraba časa, hkrati pa je plezalec neprestano izpostavljen nevarnosti padca. Odstrel pomeni invazivno in naključno vzorčenje, ki je za vzorčevalca in gozdno bioto potencialno nevaren, posek pa ne omogoča večkratnih ponovitev vzorčenja na istih osebkih in je tako v večini primerov nesprejemljiv. Z razvojem tehnologije brezpilotnih letalnikov se je na Gozdarskem inštitutu Slovenije (GIS) osnovala ideja za razvoj daljinsko upravljane naprave za jemanje vzorcev iz drevesnih krošenj.

Prvo napravo za vzorčenje v drevesnih koršnjah z brezpilotnimi letalniki so po našem vedenju skonstruirali na Oddelku za gozdno mikologijo in patologijo Univerze v Berkelyu (UC BERKELEY, 2016). Njihov sistem obsega komercialno dostopen model brezpilotnega letalnika DJI Phantom 2 (DJI, 2015) z ravnim

izvodom na koncu katerega je ostro kljukasto rezilo. Upravljalčeva naloga je, da kljukasto rezilo pravilno zatakne za vejo, nato pa jo s fizično silo, s premikanjem letalnika vzvratno, poizkuša odrezati z drevesa. Takšno Vzorčenje se še vedno izvaja relativno naključno, rezanje pa ni dovolj natančno za večino rutinskih vzorčenj. Poleg tega takšno vzorčenje ni primerno znotraj strnjene gozdnega sestoja, saj se v trenutku, ko rezilo prereže vejo, odrezana veja loči od krošnje in vlečna sila povzroči, da se brezpilotni letalnik nekontrolirano premakne v smeri vlečenja, kar lahko povzroči trčenje v sosednjo krošnjo. Poleg tega letalnik Univerze v Berkely-u ni opremljen z nikakršnim varovalnim mehanizmom, ki bi v primeru, da se rezilo zatakne znotraj krošnje, omogočil odklop rezila od brezpilotnega letalnika.

Z namenom odprave naštetih pomanjkljivosti in implementacije lastnih idej je Oddelk za gozdno fiziologijo in genetiko na GIS v sodelovanju z mladinskim tehnološko-razvojnim centrom Zavod 404 v okviru projekta EUFORINNO pripravil načrte za napravo vzorčenja drevesnih krošenj z brezpilotnim letalnikom z imenom Lucanus (GIS & ZAVOD 404, 2016; Slika 1; Slika 2).

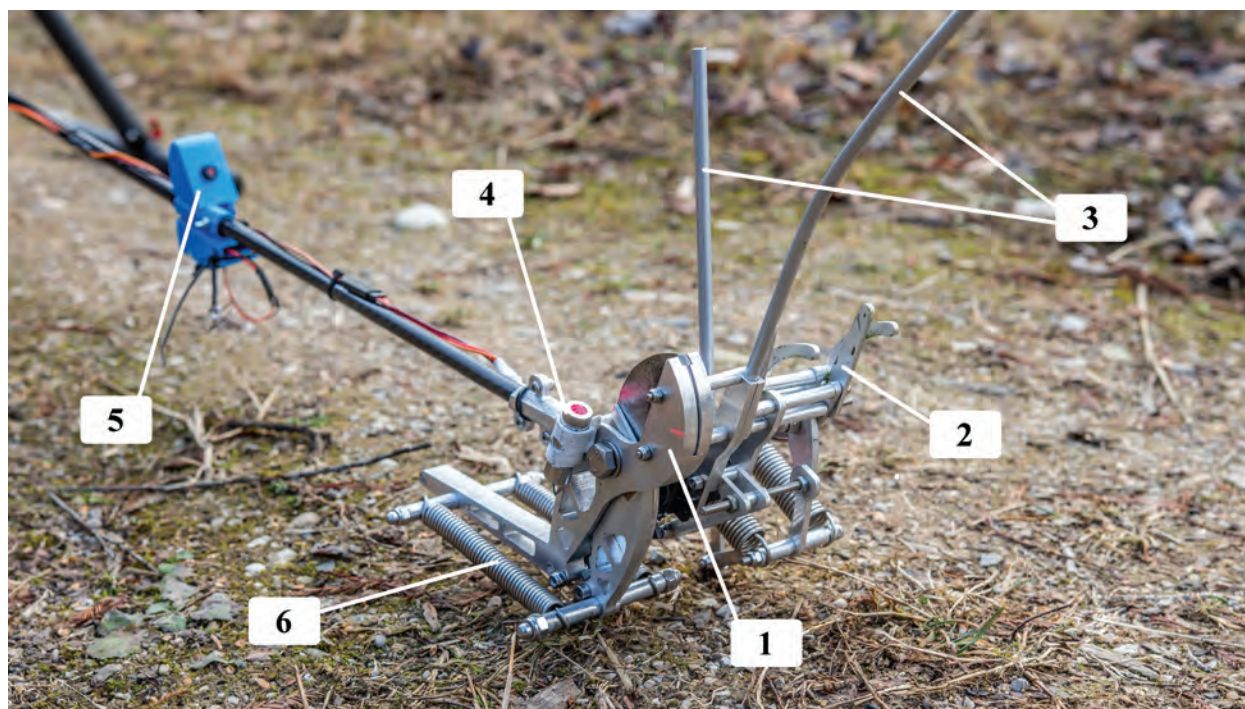


Slika 1: Prvi prototip sistema Lucanus nameščen na brezpilotnem letalniku Sky Hero Spyder X8.
Figure 1: First Lucanus system prototype mounted on a Sky Hero Spyder X8 drone.

Inovacije sistema Lucanus so zbrane na daljinsko upravljani mehanični roki, ki jo sestavljajo trije glavni moduli. Prvi modul je nastavek, s katerim je roka pritrjena na letalnik in vsebuje daljinsko prožen varovalni mehanizem, ki ob kritičnih dogodkih, ki lahko ogrozijo letalno napravo (npr. če se roka zatakne v vejah), omogoča odklop robotske roke z naprave. V nasprotju z letalnikom Univerze v Berkeley-u je rezalno orodje sistema Lucanus pritrjeno na letalnik neposredno pod njegovim težiščem, kar omogoča maksimalni izkoristek nosilnosti letalnika in hkrati ne ruši njegove stabilnosti. Drugi modul je sistem kamer, senzorjev in laserjev za daljinsko upravljanje in nadzor mehanske roke. Senzorji omogočajo natančno pozicioniranje v krošnji in lociranje reza na veji. Zadnji modulski del robotske roke predstavlja rezilo s prijemalom. Prijema-

lo zagotovi, da veja po rezu ne zdrsne z roke. Sistem vzmeti zagotavlja silo, potrebno za rezanje in prijem veje. Upravljelec vodi letalnik in odvzame vzorec s pomočjo kamere na krovu letalnika, ki prikazuje sliko na zaslonu, nameščenem na daljinskem upravljalniku. S tem je omogočeno delovanje tudi na večjih razdaljah ali celo ko upravljelec izgubi vizualni stik z letalnikom.

Sistem Lucanus je trenutno nameščen na brezpilotnem letalniku z osmimi rotorji na osnovi šasije Sky Hero Spyder X8 in z DJI-jevim avtopilotom. Brezpilotni letalnik je bil sestavljen iz komercialno dostopnih komponent in ga odlikujejo visoka stabilnost in odzivnost ter velika nosilnost, ki znaša približno 7 kg. Takšna rešitev omogoča nabiranje debelejših vej (tudi s plodovi) in v zahtevnih letalnih pogojih. Pregled prednosti in slabosti obeh sistemov je naveden v Preglednici 1.



Slika 2: Podrobni prikaz vzorčevalnega orodja sistema Lucanus. 1 – škarije; 2 – prijemalo za vzorec; 3 – vodila za zajem vzorca; 4 – laser; 5 – kamera; 6 – vzmeti.

Figure 2: Detailed view of the Lucanus sampling tool. 1 – cutter; 2 – sample grabbing tool; 3 – sample guide rods; 4 – laser; 5 – camera; 6 – operating springs.

Rešitve, ki so bile vpeljane v prototip sistema Lucanus je razvojna ekipa želela pravno zaščiti. Z dnem 30. 9. 2016 je Ministrstvo za gospodarski razvoj in tehnologijo, Urad RS za intelektualno lastnino podelilo patent, evidentiran pod številko SI 24941 (prijava št. P-201500288) z nazivom Daljinsko upravljana priprava za jemanje vzorcev iz drevesnih krošenj. Patent, ki za-

objema sistem Lucanus je tako veljaven v Republiki Sloveniji do najmanj 02. 12. 2018. Leta 2015 je bila pri Evropskem patentnem uradu (prijava št. EP16150006.1) vložena patentna prijava. Na odločbo urada za slednji patent prijavitelji še čakajo.

Prvi izdelan prototip Lucanusa je uspešno prestal javno predstavitev na EUFORINNO delavnici o gozdnem

genetskem monitoringu in genskih bankah, ki je potekala 25. januarja 2016 v Ljubljani. Sistem Lucanus omogoča natančen, selektiven in za upravljalca varen odvzem vzorcev iz drevesnih krošenj, tudi samega vrha le-teh, pri tem pa je močno zmanjšana povzročitev poškodb vzorčenega drevesa, kar je ena izmed ključnih pomanjkljivosti dosedanjih pristopov vzorčenja v drevesnih krošnjah. Kljub temu, da Lucanus že omogoča vzorčenje v drevesnih krošnjah in ga na GIS že planiramo uporabiti v tekočih in bodočih projektih, je možnosti za izboljšavo prototipa še veliko. Ključno pomanjkljivost sistema Lucanus predstavlja zahteva po visoki izurjenosti upravljalca in relativno kratka avtonomija (cca 30 min), ki pa je hiba trenutno vseh helikopterskih brezpilotnih letalnikov. Naslednje faze razvoja bodo, ob pridobitvi novih razvojnih sredstev,

zajemale artikulacijo orodja z rezilom in prijemalom v treh oseh, nastavitve naklona roke pod poljubnim kotom in razvoj sistema za napenjanje vzmeti v zraku. Ravno tako si razvojna ekipa želi čimprej integrirati RTK (real time kinematic) GPS sistem, ki bi omogočil izjemno natančnost pozicioniranja in izboljšano stabilnost letalnika, ter izboljšati zmogljivost senzorjev za zaznavo okolice. Zaradi privlačnosti takšnega sistema za širšo javnost pa bi sistem radi uporabili tudi pri vključevanju mladih v raziskovalnem delu in nadaljnjem tehnološkem razvoju. Z integracijo ustreznih senzorjev in uporabo izboljšanega avtopilota bi lahko v prihodnosti izboljšali avtonomnost sistema tako da bi lahko zgolj s pritiskom gumba letalnik poslali globoko v gozdni sesto nad točno določeno drevo, potem prevzeli nadzor nad njim in opravili rez.

Preglednica 1: Primerjava dveh prototipov za vzorčenje drevesnih krošenj z brezpilotnimi letalniki.

Table 1: Comparison of two systems for tree canopy sampling utilising unmanned aerial vehicles (UAVs) – drones.

	Lucanus	UC Berkeley »Sampler drone«
Maksimalna nosilnost <i>Maximum payload</i>	7 kg	0,67 kg
Uporabni tovor* <i>Useful payload*</i>	4,6 kg	0,3 kg**
Pozicija rezanja <i>Position of the cut</i>	Nenaključna <i>Non random</i>	Naključna <i>Random</i>
Debelina veje <i>Branch diameter</i>	≤ 1,5 cm	Tanjše veje <i>Very thin branches</i>
Število vzorčenj na let <i>N of samplings per flight</i>	1 uspešen rez, 1 poizkus <i>1 attempt, 1 successful sampling</i>	1 uspešen rez, poljubno število poizkusov <i>multiple attempts, 1 successful sampling</i>
Vzorčenje v sestoji <i>Sampling in stands</i>	Da <i>Yes</i>	Ne <i>No</i>
Varnostni mehanizem za odklop rezalne roke <i>Safety release mechanism</i>	Da <i>Yes</i>	Ne <i>No</i>
Način reza <i>Method of cutting</i>	Škarje na vzmet <i>Spring-actuated cutter</i>	S premikanjem letalnika v smeri reza <i>By pulling with the UAV</i>
Lokacija vzorčenja <i>Sampled canopy parts</i>	Vrh krošnje ali stranske veje <i>Top or side branches</i>	Stranske veje <i>Side branches only</i>
Prijemalo za vejico <i>Sample grabbing tool</i>	Da <i>Yes</i>	Ne <i>No</i>
Namestitev orodja <i>Tool location</i>	Neposredno pod težiščem <i>Directly under the center of gravity</i>	Odmaknjeno od težišča <i>Offset from the center of gravity</i>

* Uporabni tovor je definiran kot masa, ki jo letalnik lahko nosi poleg baterij in ostalih komponent, ki so nujno potrebne za normalno delovanje letalnika.

Useful payload is defined as the mass that a UAV can lift in addition to batteries and other components that are essential for normal operation.

** Dejanski varni uporabni tovor letalnika Univerze v Berkeley-u je bistveno nižji od navedenih 0,3 kg zaradi občutnega odmika rezalnika od točke težišča letalnika.

Useful safe payload of the UC Berkeley Sampler drone is substantially lower than the specified 0,3 kg due to off-setting of the cutting tool from the UAV's center of gravity.

SUMMARY

The need for collecting samples in tree canopies is common within a variety of different disciplines e.g., forest seed production, genetics, physiology, botany, phytopathology, dendrology. Currently, such sampling can be accomplished by either climbing a selected tree, cutting of the whole tree or shooting off the selected branch. However, all three above mentioned approaches have several drawbacks. They are either too expensive, too random, too time consuming, they can be dangerous or too invasive. These drawbacks could be overcome with the developments in the area of unmanned aerial vehicles (UAVs). As a matter of fact, they were firstly addressed at the UC Berkeley, The Forest Mycology and Pathology Lab (UC BERKELEY, 2016). Their solution for canopy sampling includes a commercially available UAV system DJI Phantom 2 with a hook-shaped blade attached rigidly to the drone via a straight pole. Since there are no external controls for the cutting tool, the operator must fly the UAV inside the canopy and randomly cut the sample out of it, risking impact. If the cutting tool stays lodged in the tree canopy, a lack of any safety mechanism prevents the operator to detach the cutting tool from the UAV in order to save it.

The above mentioned drawbacks were addressed and solutions devised in cooperation between the Department of forest physiology and genetics of the Slovenian Forestry Institute (SFI) and Institute 404 as a part of the EUFORINNO project. The result was UAV solution for tree canopy sampling – Lucanus (GIS & ZAVOD 404, 2016).

Lucanus is a remotely controlled mechanical arm composed of several modules. These modules include: a) connecting module that connects the tool to the UAV and also serves as a safety release mechanism allowing a quick remotely actuated detachment of the tool in case of emergency, b) the system of cameras, sensors and lasers that allows efficient and precise po-

sitioning of the UAV in the terminal approach phase and precise cutting of the sample with the mechanical arm, c) cutting/grabbing tool module composed of spring actuated cutters and sample gripping mechanism.

Imagery captured by the on-board camera is displayed on a separate LCD screen that is connected to the remote control station. This allows the operator to accomplish sampling at greater distances or even outside the line-of-sight between the UAV and the operator. Lucanus is currently installed on a custom eight-rotor UAV, based on the Sky Hero Spyder X8 airframe with a DJI autopilot. Such configuration was chosen for its high stability, responsiveness and high payload. Its maximum payload is 7 kg, which allows sampling of heavier branches or even branches bearing reproductive bodies (fruits).

The implemented solutions were applied for patent by the inventors from both SFI and Institute 404. The national patent was granted on 30. 9. 2016 under patent nr. SI 24941 by The Slovenian Intellectual Property Office (SIPO) which is an autonomous body within the Slovenian Ministry of Economic Development and Technology. Solution is currently also patent pending in European Patent Office (application no. EP16150006.1).

Lucanus was successfully publicly demonstrated at EUFORINNO Forest genetic monitoring and gene banks workshop held on January 25th 2016. Although Lucanus prototype has proven the feasibility of tree canopy sampling by UAV, the development team is already planning new improvements to make the Lucanus more user friendly and efficient. Envisioned future upgrades include implementation of the Real time kinematic GPS system (RTK), full articulation of the sampling arm, improved spring-loaded cutting system with in-flight re-cocking capability and improved sensor package.

LITERATURA - REFERENCES

- DJI, 2015: *Phantom 2 User manual v1.4*. DJI, Shenzhen, China. p 36. (http://dl.djicdn.com/downloads/phantom_2/en/PHANTOM2_User_Manual_v1.4_en.pdf, 23.12.2016)
- UC BERKELEY, 2016: Sampler drones for forestry research. Forest Pathology and Mycology Laboratory, Berkeley University of California. (<https://nature.berkeley.edu/garbelottowp/?p=1801>, 23.12.2016)
- GIS & ZAVOD 404, 2016: Sistem Lucanus. Gozdarski inštitut Slovenije / Zavod 404. (<http://lucanus.gozdis.si/>, 23.12.2016).

VIVIPARY IN *FAGOPYRUM ESCULENTUM*

ŽIVORODNOST PRI AJDI (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)

Tanveer Bilal PIRZADAH¹, Bisma MALIK¹, Inayatullah TAHIR¹ & Reiaz ul REHMAN¹

Received August 27, 2016; accepted December 16, 2016.
Delo je prispelo 27. avgusta 2016, sprejeto 16. decembra 2016.

ABSTRACT

Vivipary in *Fagopyrum esculentum*

Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) is an economically important crop, exhibiting a unique phenomenon of vivipary, which is usually a trait shown by plants growing in wet, arid and flodded conditions. Vivipary was observed in both ripe and un-ripe (green) seeds on the inflorescence. The expression of this trait in buckwheat is detrimental for the crop yield.

Key words: *Fagopyrum*, buckwheat, vivipary, germination

IZVLEČEK

Živorodnost pri ajdi (*Fagopyrum esculentum*)

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je gospodarsko pomembna poljščina, pri kateri je opazen edinstven pojav živorodnosti (viviparija), ki je običajno lastnost rastlin, ki rastejo na mokrih, suhih in poplavnih območjih. Živorodnost so opazili pri zrelih in nezrelih (zelenih) semenih na socvetju. Izražanje te lastnosti pri ajdi zmanjša uporabno vrednost pridelka.

Ključne besede: *Fagopyrum*, ajda, živorodnost, kalitev

¹ Department of Bioresources, University of Kashmir, Srinagar, India-190006

* reiazrehman@yahoo.com, pztanveer@gmail.com

1 INTRODUCTION

Buckwheats (*Fagopyrum* spp.) a dicot pseudocereal is a crop of short duration, grown in many places around the world. It's economic and health promoting effects are due to its bioactive constituents. It has abundant

rutin (flavonoid) content and has a potential for becoming main industrial source of rutin. These properties have put it among the functional foods and therapeutic medicines.

2 RESULTS AND DISCUSSION

Here we report that *Fagopyrum esculentum* Moench exhibited seed germination within the inflorescence, a well known phenomenon, known as vivipary. Predominantly vivipary is the trait of mangroves but there are reports of vivipary in some members of the family *Polygonaceae*, however buckwheat belonging to the same family usually does not show such characteristic. There has been an earlier report by KATOCH et al. (1979), however, the illustrations are vague. Vivipary has been documented in alpine, arctic (LEE & HARMER 1980, ELMQVIST & COX 1996) and tropical (FARN-SWORTH & FARRANT 2004) plants in arid and wet or flooded environments. Usually the phenomenon of vivipary is exhibited by ripe seeds but in our present investigation, some unripe seeds, green in colour, also shows this unique feature (Figure 1 C). However, no such phenomenon could be observed in other species of buckwheat. Vivipary is also significant from an ag-

ricultural perspective because it would cause loss in yield. The lack of seed dormancy is highly undesirable because the premature sprouting of grains creates a major challenge in maintaining food supplies (TSIANTIS 2006). There are few studies that have evaluated germination and vivipary in buckwheat. CORMACK (1952) found that the removal of the pericarp and seed coat resulted in the germination of dormant seeds of Tartary buckwheat. VANDEN BORN & CORNS (1958) reported that gibberellic acid (GA) improved partially the germination of after ripening seeds, but not of fully dormant seeds. It has been reported that in buckwheat the *VP* (viviparous) *1/ABI* (Absciscic Acid-Insensitive) 3 gene is responsible for controlling seed development and germination (McCARTY 1995, JONES 1997, NAKAMURA & TOYAMA 2001) and the induced mutation in this gene have been shown to cause vivipary (NAKAMURA & TOYAMA 2001).

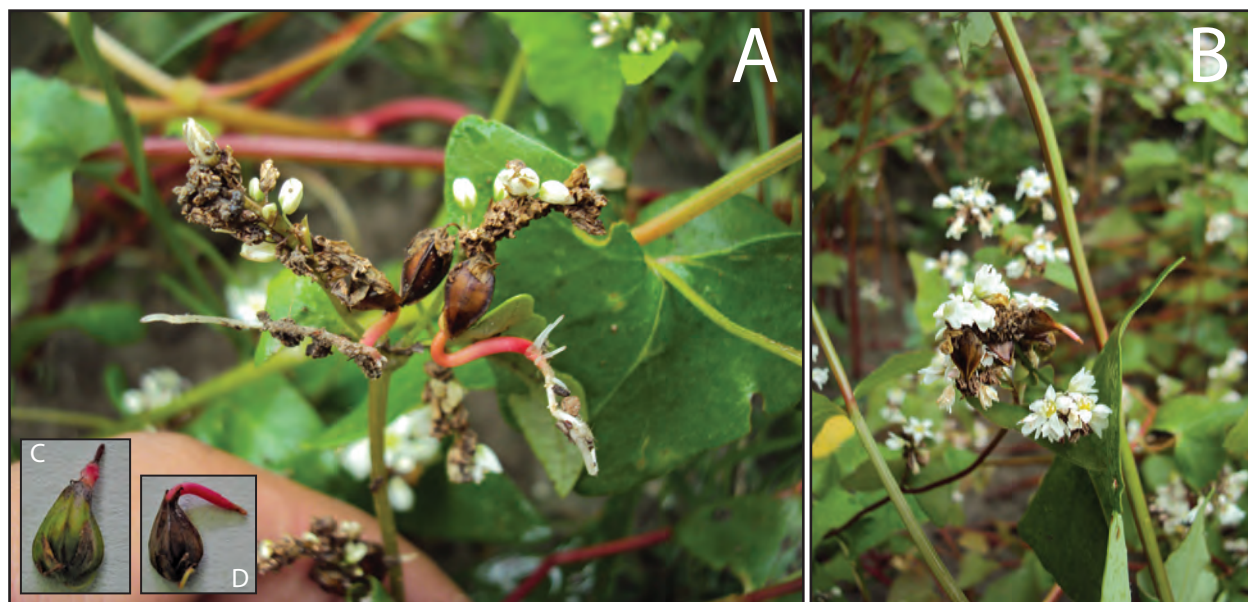


Figure 1: Panels A, B: *F. esculentum* Moench. showing vivipary, Panel C: green viviparous seed, Panel D: mature viviparous seed.

Slika 1: Podokni A, B: prikaz živorodnosti pri navadni ajdi (*F. esculentum* Moench), Podokno C: zeleno živorodno seme, Podokno D: zrelo živorodno seme.

3 POVZETEK

Ajda (*Fagopyrum* spp.) je dvokaličnica, ki se uvršča med neprava (psevido) žita. Je poljščina, ki jo pridelujejo v številnih krajih po svetu.

V tem članku bomo predstavili dobro znan pojav živorodnosti (viviparije) pri opazovani kalitvi semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) na socvetju. Živorodnost je pretežno lastnost mangrove, obstajajo pa tudi poročila o živorodnosti nekaterih vrst družine Polygonaceae, vendar ajda, ki tudi pripada k tej družini, običajno ne kaže te lastnosti. O tem so v preteklosti že poročali KATOCH et al. (1979), vendar slike niso bile primerno razločne. Živorodnost so dokumentirali pri alpskih, arktičnih (LEE & HARMER 1980, ELMQVIST & COX 1996) in tropskih (FARNSWORTH & FARRANT, 2004) rastlinah v sušnih in mokrih ali poplavljenih okoljih. Običajno je pojav živorodnosti ugotovljen pri zrelih semenih, vendar v naši sedanji raziskavi tudi nekatera nezrela semena, zelene barve, kažejo ta edinstven pojav (slika 1 C). Ven-

dar o tem pojavu še niso poročali pri drugih vrstah ajde. Živorodnost je s kmetijskega vidika neželjena zaradi izgube kakovosti pridelka. Pomanjkanje mirovanja semen (dormanca) je zelo nezaželeno, ker se zaradi prezgodnje kalitve zrn nastaja problem skladiščenja in ohranjanja zalog hrane (TSIANTIS 2006). Obstaja nekaj študij, ki so ugotovljale kalitev in živorodnost pri ajdi. CORMACK (1952) je odkril, da je odstranitev perikarpa in luščin povzročila kalitev mirujočih semen tatarske ajde. VANDEN BORN & CORNS (1958) sta poročala, da je giberelinska kislina (GA) delno izboljšala kalitev po zorenju semena, razen pri popolnoma mirujočih semenih. Ugotovljeno je bilo, da je pri ajdi gen VP (živorodna) 1 / ABI (Absciscic Acid-Insensitive) 3 odgovoren za razvoj semen ter kalitev (McCARTY 1995, JONES 1997, NAKAMURA & TOYAMA 2001) in da inducirane mutacije v tem genu povzročajo živorodnost (NAKAMURA & TOYAMA 2001).

4 REFERENCES - LITERATURA

- CORMACK, R. G. H., 1952: *A note of the dormancy of Tartary buckwheat seeds*. Scient. Agr. (Rio de Janeiro) 32: 170-172.
- COTA-SÁNCHEZ, J. H., 2004: *Vivipary in the Cactaceae: its taxonomic occurrence and biological significance*. Flora (Jena) 199: 481-490.
- ELMQVIST, T. & P. A. COX, 1996: *The evolution of vivipary in flowering plants*. Oikos (Copenhagen) 77: 3-9.
- FARNSWORTH, E. & J. M. FARRANT, 1998: *Reductions in abscisic acid are linked with viviparous reproduction in mangroves*. Am. J. Bot. (Baltimore) 85: 760-769.
- JONES, R. D., N. C. PETERS & M. J. HOLDSWORTH, 1997: *Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the VIVIPAROUS I homologue in embryos of Avena fatua*. Plant J. (Oxford) 12: 911-920.
- KATOCH, P. C., S. BAKSH, S. D. BHARDWAJ & A. N. KAUSHAL, 1979: *A report of Vivipary in buckwheat (Fagopyrum sp.)*. Curr. Sci. (Bengaluru) 48 (10): 446.
- LEE, J. A. & R. HARMER, 1980: *Vivipary: a reproductive strategy in response to environmental stress?* Oikos (Copenhagen) 35: 254-265.
- McCARTY, D. R., 1995: *Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development*. Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol. (Palo Alto) 46: 71-93.
- NAKAMURA, S. & T. TOYAMA, 2001: *Isolation of a VPI homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars*. J. Exp. Bot. (Oxford) 52: 875-876.
- TOYAMA, T., S. NAKAMURA & M. YAMAMORI, 2004: *Isolation of a VIVIPAROUS I/ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 homologue from common buckwheat*. Fagopyrum (Kyoto) 21: 27-34.
- TSIANTIS, M., 2006: *Plant development: multiple strategies for breaking seed dormancy*. Curr. Biol. (Amsterdam) 16: R25-R27.
- VANDEN BORN, W. H. & W. G. CORNS, 1958: *Studies on seed dormancy, plant development, and chemical control of Tartary buckwheat (Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn.)*. Can. J. Plant Sci. (Ottawa) 38: 357-366.

MAGNESIUM AND PHOSPHORUS DISTRIBUTIONS IN DEVELOPING TARTARY BUCKWHEAT COTYLEDONS

RAZPOREDITEV MAGNEZIJA IN FOSFORJA V RAZVIJAJOČIH SE KLIČNIH LISTIH TATARSKE AJDE

Paula PONGRAC^{1,a,*}, Peter KUMP², Bojan BUDIČ³, Katarina VOGEL-MIKUŠ^{1,2}

ABSTRACT

Magnesium and phosphorus distributions in developing tartary buckwheat cotyledons

Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) is a gluten-free pseudocereal with good mineral element composition of grain. In particular, Tartary buckwheat grains have greater magnesium (Mg) concentration than cereal grains. In (pseudo)cereal grain, Mg is bound to phytic acid, a phosphorus (P)-rich compound responsible for poor availability of Mg in the diet. The aim of the study was to evaluate changes in cell-type specific distribution of Mg and P in cotyledons of Tartary buckwheat grain and in 5-day-old and 8-day-old sprouts. Low-energy-X-ray-fluorescence mapping revealed considerable co-localisation of Mg and P in globoid-like structures in cotyledons. In the grain these globoid-like structures were numerous and appeared in mesophyll cells of the cotyledons. In 5-day-old sprouts less Mg-P co-localisation was seen in mesophyll cells. In 8-day-old sprouts co-localisation of Mg and P was less confined to globoid-like structures in the mesophyll cells indicating the degradation of these globoids and release of Mg, presumably for different metabolic processes that occur during seedling development. The extent to which Mg release from phytic acid in sprouts correlates with the bioavailability of Mg during digestion remains to be investigated.

Keywords: *Fagopyrum tataricum*, X-ray fluorescence micro-spectroscopy, sprouts, phytic acid, germination

IZVLEČEK

Razporeditev magnezija in fosforja v razvijajočih se kličnih listih tatarske ajde

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) je ne-pravo žito, ki ne vsebuje glutena in ima za prehrano ugodno mineralno sestavo. Zrnje tatarske ajde vsebuje na primer več magnezija (Mg) kot zrna pravih žit. V zrnju pravih, kot ne-pravih žit, je Mg močno vezan na fitinsko kislino, organsko spojino, ki je zgrajena iz velikega števila atomov fosforja (P). Omenjena vezava je odgovorna za slabo topnost Mg in slabo biodostopnost Mg v prehrani. Namen študije je bil ovrednotiti spremembe v razporeditvi Mg in P v razvijajočih se kličnih listih tatarske ajde. Preučevali smo klične liste v zrnju, v pet in osem dni starih kalih tatarske ajde. S pomočjo nizko-energijske rentgensko fluorescenčne mikrospektroskopije smo na celičnem nivoju v kličnih listih zrn potrdili močno kolokalizacijo Mg in P v globoidnih strukturah. V kličnih listih pet dni starih kalih se je stopnja kolokalizacije zmanjšala in globoidne strukture so bile manj številne. Stopnja kolokalizacije v kličnih listih osem dni starih kalih se je še dodatno zmanjšala, kar je nakazovalo na razgradnjo kompleksov fitinske kisline in Mg, verjetno kot posledica metabolnih potreb kalice po Mg. Potrebne so nadaljnje raziskave, s katerimi bi ovrednotili povezavo med postopnim sproščanjem Mg s fitinske kisline v kalih in biodostopnostjo Mg v prebavilih.

Ključne besede: *Fagopyrum tataricum*, rentgensko fluorescenčna mikro-spektroskopija, kalice, fitinska kislina, kalitev

¹ Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

² Jožef Stefan Institute, Jamova 37, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

³ National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^a Current address:

* Corresponding author: Paula Pongrac, The James Hutton Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, United Kingdom, Telephone: +44138258855, Email: paula.pongrac@gmail.com

1 INTRODUCTION

Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) is a good source for secondary metabolites and mineral elements (BONAFACCIA et al. 2003a, b), particularly in people with coeliac disease, as it is a gluten-free pseudocereal. Tartary buckwheat grain and sprouts contain greater concentration of magnesium (Mg) than wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and sprouts (PONGRAC et al. 2016a), which is strongly linked to the phylogenetic origin of the two species. Tartary buckwheat belongs to the family *Polygonaceae* within the order Caryophyllales, while wheat belongs to the *Poaceae* within the Poales. Species from the Caryophyllales (and Oxalidales) generally have greater concentrations of Mg in shoots compared to other orders within Angiosperms, including Poales (WHITE et al. 2015). Since Mg is highly phloem mobile (HAWKESFORD et al. 2012), greater shoot Mg concentration will result in greater Mg concentration of phloem-fed tissues, such as grains. Considering that Mg is one of the mineral elements often lacking in human diets (WHITE & Broadley 2009), identification of crops and plant species that are likely to have greater shoot Mg concentration could augment human and animal diets (WHITE et al. 2015, NIELSEN 2015), even though the final Mg concentrations in shoots will ultimately depend on available soil Mg concentrations.

Grain is a major component of daily diets and, as such, a major source of essential mineral elements. In grain mineral elements are tightly bound to phosphorus (P)-rich phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate) forming phytates. This enables appropriate storage environment for mineral elements in dormant grains. However, when grains are consumed mineral elements bound to phytic acids are poorly bioavailable to monogastric animals (BOHN 2008). Magnesium and potassium (K) are typical counter-ions in phytate salts (RABOY 1997). Using techniques for visualisation of mineral element distribution in plant material, co-localisation of P, Mg and K in (pseudo)cereal grain has been demonstrated (PONGRAC et al. 2013a, WU & BECKER 2012, REGVAR et al. 2011). In addition, absorption of Mg from white wheat bread was significantly impaired by the addition of phytic acid, in a dose-dependent manner, at amounts similar to those naturally present in whole-meal and brown bread (BOHN et al. 2004). These observations support strong interaction of Mg and P in (pseudo)cereal grain and in the diets.

During grain soaking and germination, phytates are enzymatically broken down by the enzyme phytase leading to the release of mineral elements required by the growing embryo and the developing seedling. Consequently, soaked grains and seedlings (sprouts) are believed to be nutritionally advantageous (HOLTZ and GIBSON 2007, NELSON et al. 2013). In addition, sprouting was shown to result in increased concentrations of mineral elements (PONGRAC et al. 2016a, LINTSCHINGER et al. 1997) although the extent of the increase depended on plant species and the mineral-element composition of the water used for sprout cultivation (LINTSCHINGER et al. 1997, LIU et al. 2007, PONGRAC et al. 2016a). The observed increase in mineral element concentration is arguably a result of the conversion of the dry matter and the uptake of mineral elements by developing roots. Dry matter of the grain (mostly non-fibrous storage carbohydrates) is converted to energy for growth of the embryo and seedling. With activation of metabolic processes requirements of mineral element change and this can be observed as a change in the distribution of mineral elements during sprouting, especially for sulphur (S), K, calcium (Ca) and Fe (PONGRAC et al. 2016a, b). No redistribution of P and Mg was seen in hydrothermally processed grains (groats) of Tartary buckwheat, but a slight redistribution was seen in 8-day-old sprouts when compared to the grain (PONGRAC et al. 2016b). Thus, it appears that hydrothermal processing does not affect phytate-mineral-element complexes in cotyledons significantly, but germination does.

The aim of the study was to resolve the distribution of Mg and P in developing cotyledons of Tartary buckwheat. We hypothesised that it is possible to demonstrate degradation of P-Mg complexes in developing Tartary buckwheat cotyledons by visualising mineral element distributions. Since analysis of Mg distribution using X-ray fluorescence (XRF)-based techniques is limited by low fluorescence yield of low-Z elements (e.g. sodium, Mg, aluminium, silicon and P; VOGEL-MIKUŠ et al. 2012) the use of specialised facilities providing spatially resolved information for low-Z elements was required. For this purpose, the low-energy XRF microscopy beamline (TwinMic) of the synchrotron Elettra, Trieste, Italy, which enables simultaneous determination of Mg and P distribution in plant material (KAULICH et al. 2009) was utilised.

2 MATERIALS AND METHODS

Grain of Tartary buckwheat was obtained from Mlin Rangus (Dolenje Vrhpolje at Šentjernej, Slovenia). Mature, air-dried grain was kept in paper bags in the dark at room temperature. Sprouts were grown in an automatic sprouter (EasyGreen® MicroFarm System, Easy-Green Factory Inc., Nevada, USA) where they were watered by misting every 3 h during the day (five times), and twice during the night (with a 4-h and 5-h gap). Five-day-old and 8-day-old sprouts were removed from the sprouter. These two stages were selected, as on the fifth day sprouts were in a shedding stage in which cotyledons are not yet fully developed and are still enclosed in the husk. Prior to the analysis, husks were manually removed from the cotyledons. On the eighth day, cotyledons were fully unfolded and sprouts at this stage could be directly consumed (the husk has fallen off the cotyledon). A schematic illustration of the material investigated is provided in *Fig. 1*.

For bulk mineral element analyses, sprouts were washed in bidistilled water, roots were removed and cotyledons and hypocotyls were dried at 60 °C for three days. Mature whole grains and dried (root-less) sprouts were homogenised in liquid nitrogen, using a pestle and a mortar, and kept at -20 °C in air-tight containers. Homogenised material was wet digested in a microwave oven (Ethos 1, Milestone, Sorisole, Italy) and concentrations of P and Mg were measured with inductively coupled plasma-mass spectrometry and inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy as described previously (PONGRAC et al. 2013b).

For X-ray fluorescence (XRF) microscopy, mature grain, pre-soaked for 4 hours at 4 °C, and pieces of coty-

ledons were frozen in propane cooled with liquid nitrogen and 25 µm thick sections were cut using a cryotome at -25 °C. Sections were freeze-dried (Alpha Christ 2-4, Osterode am Harz, Germany) at -30 °C and 0.210 mbar for three days and mounted between two layers of picroform (VOGEL-MIKUŠ et al. 2009, 2014) stretched onto aluminium holders. Cross-sections were scanned in vacuum at the 2200 eV on TwinMic beamline, synchrotron Elettra, Trieste, Italy. The beam was focused to 1.2 µm² using a scanning X-ray microscope zone plate. X-rays were used to image structural make-up of Tartary buckwheat cotyledons and X-ray fluorescence was used to determine spatial distributions of Mg and P. X-ray fluorescence spectra were fitted with PyMCA (SOLÉ et al. 2007) and quantified using a software for quantitative micro-XRF analysis developed by P. Kump (Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia). Sample thickness was calculated in each pixel on the basis of absorption measurements as measured using a CCD system positioned behind the sample (KAULICH et al. 2009). Cellulose was taken as a matrix in the quantification procedure (KOREN et al. 2013). Quantitative maps and two coloured co-localisation images were generated using PyMCA software (SOLÉ et al. 2007). Concentrations of Mg and P in cotyledons were extracted from the quantitative distribution maps using ImageJ software (ABRAMOFF et al. 2004; VOGEL-MIKUŠ et al. 2014). Statistically significant differences in concentrations of Mg and P between developmental stages were determined by Student-Newman-Keuls post-hoc tests (at $p < 0.05$) after analysis of variance using GenStat software (64-bit Release 17.1; VSN International Ltd, Oxford, UK).

3 RESULTS AND DISCUSSION

Distributions of Mg and P were studied in developing cotyledons of Tartary buckwheat. Three stages in the development of Tartary buckwheat cotyledons were selected (*Fig. 1*). The first stage was mature grain, the second was shedding stage and the third was ready-to-eat stage. Bulk concentrations of Mg and P in dry matter increased during cotyledon development (*Fig. 2*) in line with previous results (PONGRAC et al. 2016a). This increase is due to the conversion of dry matter (storage compounds) to energy used in growth and seedling development, and of root uptake of mineral elements from the solution used for irrigation.

Tartary buckwheat grain contained greater average bulk concentration of Mg (2110 mg kg⁻¹ dry weight)

than reported for 125 Tartary buckwheat accessions from China (1523 mg kg⁻¹ dry weight) but was within the minimum – maximum range, namely 729 - 3104 mg kg⁻¹ (HUANG et al. 2014). This indicates relative stability of Mg concentrations in Tartary buckwheat grain, regardless of the environmental conditions.

Phosphorus concentration in cotyledon was greater than Mg concentrations at all stages of development; however the P to Mg (P/Mg) concentration ratio decreased during the cotyledon development (*Fig. 2*). This is in line with our previous observations of Tartary buckwheat grains and 8-day-old sprouts (*Table 1*; PONGRAC et al. 2016a). Considering that total grain P and P in phytic acid are highly and positively correlat-

ed (RABOY 1997), total P can be used as proxy for estimating phytate concentration in plants. Hence a lower P/Mg ratio indicates lower phytate to Mg ratio, which might positively affect solubility and bioavailability of Mg. Indeed, at molar ratios of phytic acid to Mg below 0.16 an increased solubility of Mg was demonstrated at pH>6 (CHERYAN et al. 1983). In grain and seed of different crops P/Mg ratio is typically above 1 (Table 1). In potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, another phloem-fed tissue, P/Mg ratio was 1.3 (KÄRENLAMPI & WHITE 2009). In wheat sprouts irrigated with tap water the ratio was much greater than in grains, namely 5.1, and much greater than in Tartary buckwheat sprouts (Table 1) which was a consequence of unchanged Mg concentration and increased concentration of P in wheat sprouts (PONGRAC et al. 2016a). When the same sprouts were irrigated with a solution containing 5.6-times greater Mg concentration, P/Mg ratio decreased in both species (Table 1; PONGRAC et al. 2016a). In leaves, lower P/Mg ratios have been reported (Table 1). Among grains noticeably lower P/Mg ratios have been reported for both buckwheat species and quinoa (these are pseudocereals) compared to cereal grain and edible seeds from Fabales (pulses: e.g. bean, pea, lentil, chick-pea). Presumably this is a result of the phylogenetically-dependent greater Mg concentrations in Caryophyllales species (buckwheat and quinoa) than cereal (Poales) species (WHITE et al. 2015). As argued previously, this might positively affect availability of Mg from grains of plants from Caryophyllales (buckwheats and quinoa) in comparison to cereal grains and edible seeds from Fabales (pulses). Furthermore, from a dietary perspective, leaves that have lower P/Mg ratios might be advantageous for ensuring increased Mg intakes. For further discussion on plant-sourced Mg and Mg requirements in human diets see NIELSEN (2015).

To study the distribution of Mg and P in developing Tartary buckwheat cotyledons the low-energy XRF beamline TwinMic, synchrotron Elettra, Trieste, Italy, was utilised. An excitation of 2200 eV provided information on the structure of cross-sectioned plant material and access to spatially resolved information on P and Mg distribution at the cell-type specific level. Moreover, presence of these two mineral elements was determined simultaneously (Fig. 3). Magnesium and P co-localised in globoid structures densely dispersed within the cells of cotyledon in the grain (Fig. 4 top panels). These globoids have previously been reported to contain zinc (Zn), Fe, copper and also manganese (PONGRAC et al. 2013a). Similarly, in the aleurone layer of wheat grain such globoids were composed of P, Mg, Zn, Fe and sodium (REGVAR et al. 2011) and of K (LOTT & SPITZER 1980). These globoids are discrete, electron-

dense globular inclusions in single-membrane storage micro-bodies, which can contain crystalline or amorphous storage protein deposits with functions resembling those of the vacuole in non-storage cells (RABOY 1997). In 5-day-old Tartary buckwheat sprouts fewer globoids were seen (Fig. 4 middle panels) which is likely a result of the digestion of globoids and dilution as seedlings grow. These cotyledons are still enclosed in the husk, which means the cotyledons have not yet been in direct contact with the light. The 8-day-old sprouts had fully developed cotyledons (Fig. 1), which were of darker green colour and had a more defined epidermal layer (Fig. 4 bottom left panels). Here the distribution of Mg and P was no longer confined to globoid structures but instead Mg and P were spread more evenly in mesophyll cells (Fig. 4 bottom panels) indicating degradation of phytate globoids. In co-localisation images Mg was indicated in green and P in red (Fig. 4 right panels). A mixture of these two colours, i.e. co-localisation in particular pixel, yields a yellow colour. In grain yellow colour, hence the co-localisation of P and Mg appears throughout the cotyledons, while in the sprouting cotyledons, there are fewer co-localisations with less intensity.

In cotyledons of grains and 5-day-old and 8-day-old sprouts little Mg was located in the epidermal layer (Fig. 4), which is in line with the function of Mg as an essential component of chlorophyll and protein synthesis and functioning (HAWKESFORD et al. 2012). Cotyledons of 5-day-old sprouts do not photosynthesise yet since they have not been exposed to light, hence it can be argued that extensive remobilisation of Mg from phytate globoids was not required at this stage. By contrast, cotyledons of 8-day-old sprouts have been fully exposed to the light, thus location of Mg at this developmental stage might be a result of increased requirement for photosynthetic activity and protein synthesis (HAWKESFORD et al. 2012). Light-triggered reactions increase the concentration of Mg of the stroma and increase pH (HAWKESFORD et al. 2012). In combination these changes are sufficient to increase the activity of ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase and also of other stromal enzymes which depend on high Mg concentrations and have a pH optimum above 6 (HAWKESFORD et al. 2012).

Concentrations of P and Mg in cotyledons were extracted from P and Mg distribution maps using ImageJ software (ABRAMOFF et al. 2004; KOREN et al. 2013). These concentrations are referred to as cotyledon-specific Mg and P concentrations, because only part of the cotyledons was mapped in this study. As seen in bulk data (Fig. 2) the P concentrations in cotyledons were greater than Mg at all stages of development, although P/Mg ratio decreased (Fig. 5). However, the greatest con-

centrations of P were seen in grain cotyledon. This in contrast to bulk P concentrations (Fig. 2) and is a consequence of whole grain containing tissues which contain lower P concentrations (endosperm and husk; PONGRAC et al. 2013a). In cotyledon-specific analyses reported in Fig. 5 only cotyledons were analysed. Cotyledons of 5-day-old sprouts contained smaller P and Mg concen-

trations than cotyledons in the grain, presumably a result of translocation of P and Mg for the growth of roots and hypocotyl, which represent sinks for P and Mg. The Mg concentration in 8-day-old sprouts was greater than in 5-day-old sprouts, which indicates increased needs for Mg in chlorophyll synthesis accompanied by mineral element uptake by newly developed roots.

4 CONCLUSIONS

Tartary buckwheat grain (and other grain from plants belonging to Caryophyllales) was identified as having a more favourable P/Mg ratio than cereal grains or pulses. During cotyledon development a decrease in P/Mg concentration ratios was observed. Using low-energy XRF mapping for simultaneous determination of the distribution of Mg and P in developing cotyledons of Tartary buckwheat relocation of Mg and P was visu-

alised. The observed changes in the distributions of Mg and P are likely a result of metabolic changes taking place during development from dormant grains to growing seedlings. The extent to which potential release of Mg from P groups in phytate globoids in the developing Tartary buckwheat cotyledons is linked to increased bioavailability of Mg in the diet remains to be investigated.

5 POVZETEK

5.1 Uvod

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) je nepravo žito, ki ne vsebuje glutena in ima za prehrano ugodno mineralno sestavo. Na primer, zrnje tatarske ajde ima večjo koncentracijo magnezija (Mg) kot zrnje žit. V zrnju pravih in nepravih žit je Mg močno vezan na fitinsko kislino, organsko spojino, ki je zgrajena iz velikega števila atomov fosforja (P). Zaradi omenjene vezave je Mg slabo topen in slabo biodostopen v prehrani. Namen študije je bil določiti koncentracije Mg in P v zrnju in kličnih listih kalic tatarske ajde in ovrednotiti spremembe v razporeditvi Mg in P v razvijajoči se kličnih listih tatarske ajde.

5.2 Materiali in metode

Preučevali smo klične liste v zrnju, v pet in osem dni starih kalicah tatarske ajde (Slika 1). Za določitev skupnih koncentracij Mg in P smo zrna in kalice posušili in razklopili v mikrovalovki. Koncentracije Mg in P smo izmerili z masno spektrometrijo z induktivno sklopjeno plazmo. Razporeditev Mg in P na celičnem nivoju smo določili s pomočjo nizko-energijske rentgensko fluorescenčne mikroskopije na prečnih prerezech kličnih listov, ki so bili pripravljeni s hitrim zamrzovanjem in liofilizacijo.

5.3 Rezultati in razprava

Koncentraciji Mg in P sta naraščali od zrnja do osem dni starih kalic, medtem ko je razmerje med koncentracijami P in Mg padalo (Slika 2). Manjše razmerje med P/Mg je zaželeno v naši prehrani, saj je koncentracija P dobro merilo za količino fitinske kisline, ki, kot je bilo že omenjeno, omejuje absorpcijo Mg v naši prebavi. Med zrnji in semeni imajo zrna rastlin, ki sodijo v red klinčnikovcev (Caryophyllales) bolj ugodno razmerje P/Mg kot zrna pravih žit in stročnic (Tabela 1). Najbolj ugodno razmerje med P in Mg je v listih rastlin.

Tehnika nizko-energijske rentgensko fluorescenčne mikroskopije omogoča analizo morfološke zgradbe analiziranega tkiva in hkratno določitev razporeditve Mg in P (Slika 3). V kličnih listih zrnja smo z omenjeno tehniko pokazali močno kolokalizacijo Mg in P, ki pa se je tekom razvoja kličnih listov postopno manjšala (Slika 4).

5.4 Zaključki

Rezultati potrjujejo, da lahko s tehnikami vizualizacije razporeditve Mg in P orišemo kemijske spremembe v rastlinskem tkivu, v tem primeru razgradnjo kompleksov fitinske kisline in Mg. Potrebne so nadaljnje raziskave, s katerimi bi ovrednotili povezavo med postopnim sproščanjem Mg s fitinske kisline v razvijajočih se kličnih listih tatarske ajde in biodostopnostjo Mg v prebavi.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Prof. Marjana Regvar and Prof. Ivan Kreft for their steadfast support and scientific discussions. This study was supported by the Slovenian Research Agency through P1-0212 Programme and by the Z4-4113 and L4-7552 Projects. Paula Pongrac acknowledges Marie Curie IntraEuropean Fellowship (REA grant agreement n°623305), the Bilateral Exchange Grant between the Royal Society of Edinburgh and the Slovenian Academy of Sciences and

Arts, and Nutrition Institute, Ljubljana, Slovenia. Anton Rangus is acknowledged for providing Tartary buckwheat grain and synchrotron Elettra, Trieste, Italy for provision of synchrotron radiation facilities at beamline TwinMic (project 20135190). Authors are grateful to the beamline scientist Dr. Alessandra Gianoncelli for her assistance in using the beamline. We thank Prof. Philip J. White for reading original manuscript.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se prof. dr. Marjani Regvar in akademiku prof. dr. Ivanu Kreftu za njuno podporo in številne znanstvene razprave. Študijo je podprla Javna agencija za raziskovalno dejavnost republike Slovenije preko programske skupine P1-0212 in projektov Z4-4113 in L4-7552. Paula Pongrac se zahvaljuje za finančno podporo Evropske komisije v okviru Marie Curie štipendije, sredstva v okviru mednarodne izmenjave med Royal Society of Edinburgh in Slovensko akadem-

ijo znanosti in umetnosti in Inštitutu za nutricionistiko v Ljubljani. Zahvaljujemo se Antonu Rangusu za zrnje tatarske ajde in sinhrotronu Elettra v Trstu za čas na žarkovni liniji TwinMic (številka projekta 20135190). Posebej se zahvaljujemo znanstvenici na žarkovni liniji TwinMic, Dr. Alessandri Gianoncelli za pomoč pri analizah in prof. dr. Philipu J. White-u za komentarje na prvo verzijo članka.

REFERENCES - LITERATURA

- ABRÀMOFF, M. D., P. J. MAGALHÃES & S. J. RAM, 2004: *Image processing with ImageJ*. Biophotonics International 11 (Pittsfield), str. 36-42.
- BONAFACCIA, G., L. GAMBELLI, N. FABIAN & I. KREFT, 2003a: *Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat*. Food Chemistry 83 (Amsterdam), str. 1-5.
- BONAFACCIA, G., M. MAROCCHINI & I. KREFT, 2003b: *Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat*. Food Chemistry 80 (Amsterdam), str. 9-15.
- BASHIR, E. M. A., A. M. ALI, A. M. ALI, A. E. MECHINGER, H. K. PARZIES & B. I. G. HAUSSMANN, 2014: *Characterization of Sudanese pearl millet germplasm for agro-morphological traits and grain nutritional values*. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 12(1) (Cambridge), str. 35-47.
- BOHN, T., L. DAVIDSSON, T. WALCZYK & R. HURRELL, 2004: *Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans*. The American Journal of Clinical Nutrition 79 (Rockville), 418-423.
- Bohn, T., 2008: Dietary factors influencing magnesium absorption in humans. Current Nutrition & Food Science 4(1) (Sharjah), str. 53-72.
- BROADLEY, M. R., J. P. HAMMOND, G. J. KING, D. ASTLEY, H. C. BOWEN, M. C. MEACHAM, A. MEAD, D. A. C. PINK, G. R. TEAKLE, R. M. HAYDEN, W. P. SPRACKLEN & P. J. WHITE, 2008: *Shoot calcium and magnesium concentrations differ between subtaxa, are highly heritable, and associate with potentially pleiotropic loci in Brassica oleracea*. Plant Physiology 146 (Rockville), str. 1707-1720.
- BROADLEY, M. R., S. Ó. LOCHLAINN, J. P. HAMMOND, H. C. BOWEN, I. ÇAKMAK, S. EKER, H. ERDEM, J. G. KING & P. J. WHITE, 2010: *Shoot zinc (Zn) concentrations varies widely with Brassica oleracea L. and is affected by soil Zn and phosphorus (P) levels*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 85 (Didcot), str. 375-380.
- CHERYAN, M., ANDERSON F. W., & F. GRYNSPAN, 1983: *Magnesium-phytate complexes: Effect of pH and molar ratio on solubility characteristics*. Cereal Chemistry 60(3) (St. Paul), str. 235-237.

- HAWKESFORD, M., W. HORST, T. KICHEY, H. LAMBERS, J. SCHJOERRING, I. S. MØLLER & P. J. WHITE, 2012: *Functions of macronutrients*. In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. MARSCHNER, P. (Ed), Academic Press, Elsevier (Amsterdam), str. 135-190.
- HOLTZ, C. & R. S. GIBSON, 2007: *Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plant-based diets*. Journal of Nutrition 137 (Rockville), str. 1097-1100.
- HUANG, X-Y., F. J. ZELLER, K-F. HUANG, T-X. SHI, & Q-F. CHEN, 2014: *Variation of major minerals and trace elements in seeds of tartary buckwheat (Fagopyrum tataricum Gaertn.)*. Genetic Resources and Crop Evolution (Berlin) 61: str. 567-577.
- KARAKÖY, T., H. ERDEM, F. S. BALOCH, F. TOKLU, S. EKER, B. KILIAN & H. ÖZKAN, 2012: *Diversity of macro- and micronutrients in the seeds of lentil landraces*. The Scientific World Journal Article ID 710412 (Cairo), str. 1-9.
- KÄRENLAMP, S. O. & P. J. WHITE, 2009: *Potato proteins, lipids and minerals*. In: Advances in Potato Chemistry and Technology. SINGH J. & L. KAUR, (Eds). Academic Press, Elsevier (Amsterdam), str. 99-126.
- KAULICH, B., A. GIANNONCELLI, A. BERAN, D. EICHERT, I. KREFT, P. PONGRAC, M. REGVAR, K. VOGEL-MIKUŠ & M. P. KISKINOVA, 2009: *Low-energy X-ray fluorescence microscopy opening new opportunities for bio-related research*. Journal of the Royal Society Interface 6 (London), str. S641-S647.
- KOREN, Š., I. ARČON, P. KUMP, M. NEČEMER & K. VOGEL-MIKUŠ, 2013: *Influence of CdCl₂ and CdSO₄ supplementation on Cd distribution and ligand environment in leaves of the Cd hyperaccumulator Noccaea (Thlaspi) praecox*. Plant and Soil 370 (Berlin), str. 125-148.
- LINTSCHINGER, J., N. FUCHS, H. MOSER, R. JÄGER, T. HLEBEINA, G. MARKOLIN & W. GÖSSLER, 1997: *Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa*. Plant Foods for Human Nutrition 50 (Berlin), str. 223-237.
- LIU, C-L., Y-S. CHEN, J-H. YANG, B-H., CHIANG & C-K. HSU, 2007: *Trace element water improves the antioxidant activity of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) sprouts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (Washington), str. 8934-8940.
- LOTT, J. N. A. & E. SPITZER, 1980: *X-ray analysis studies of elements stored in protein body globoid crystals of triticum grains*. Plant Physiology (Rockville) 66, str. 494-499.
- NELSON, K., L. STOJANOVSKA, T. VASILJEVIC & M. MATHAI, 2013: *Germinated grains: a superior whole grain functional food?* Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 91 (Ottawa), str. 429-441.
- NIELSEN, F. H., 2015: *Importance of plant sources of magnesium for human health*. Crop & Pasture Science 66(12) (Clayton), str. 1259-1264.
- PINSON, S. R. M., L. TARPLEY, W. YAN, K. YEATER, B. LAHNER, E. YAKUBOVA, X-Y. HUANG, M. ZHANG, M. L. GUERINOT & D. E. SALT, 2015: *Worldwide genetic diversity for mineral element concentrations in rice grain*. Crop Science 55 (Madison), str. 294-311.
- PONGRAC, P., K. VOGEL-MIKUŠ, L. JEROMEL, P. VAVPETIČ, P. PELICON, B. KAULICH, A. GIANONCELLI, M. REGVAR, D. EICHERT & I. KREFT, 2013a: *Spatial distribution of mineral elements in tartary buckwheat (Fagopyrum tataricum) grain as revealed by micro-imaging techniques*. Food Research International 54 (Amsterdam), str. 125-131.
- PONGRAC, P., I. KREFT, K. VOGEL-MIKUŠ, M. REGVAR, M. GERM, N. GR LJ, L. JEROMEL, D. EICHERT, B. BUDIČ & P. PELICON, 2013b: *Relevance for food sciences of quantitative spatially resolved element profile investigation in wheat (Triticum aestivum) grain*. Journal of Royal Society Interface 10 (London), 20130296.
- PONGRAC, P., M. POTISEK, A. FRAŠ, M. LIKAR, B. BUDIČ, K. MY SZKA, D. BOROS, M. NEČEMER, M. KELEMEN, P. VAVPETIČ, P. PELICON, K. VOGEL-MIKUŠ, M. REGVAR & I. KREFT, 2016a: *Composition of mineral elements and bioactive compounds in Tartary buckwheat and wheat sprouts as affected by natural mineral-rich water*. Journal of Cereal Science 69 (Amsterdam), str. 9-16.
- PONGRAC, P., K. VOGEL-MIKUŠ, M. POTISEK, E. KOVAČEC, B. BUDIČ, P. KUMP, M. REGVAR & I. KREFT, 2016b: *Mineral and trace element composition and importance for nutritional value of buckwheat grain, groats and sprouts*. In: Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. ZHOU, M., I. KREFT, S-H. WOO, N. CHRUNGGOO, & G. WIESLANDER, (Eds), Academic Press, Elsevier (Amsterdam), str. 261-272.
- PRADO, F. E., FERNÁNDEZ-TURIEL, J. L., PSARAS, G. K. & J. A. GONZÁLEZ, 2014: *Variation of seed mineral concentrations in seven quinoa cultivars grown in two agroecological sites*. Cereal Chemistry 91(5) (St. Paul), str. 453-459.
- RABOY, V. 1997: *Accumulation and storage of phosphate and minerals*. In: Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, 4: Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development. LARKINS B. A. & I. K. VASIL, (Eds), Springer (Berlin), str. 441-478.

- REGVAR, M., D. EICHERT, B. KAULICH, A. GIANONCELLI, P. PONGRAC, K. VOGEL-MIKUŠ, & I. KREFT, 2011: *New insights into globoids of protein storage vacuoles in wheat aleurone using synchrotron soft X-ray microscopy*. Journal of Experimental Botany 62(11) (Oxford), str. 3929-3939.
- SOLÉ, V. A., E. PAPILLON, M. COTTE, P. WALTER & J. SUSINI, 2007: *A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra*. Spectrochimica Acta B 62 (Amsterdam), str. 63-68.
- VOGEL-MIKUŠ, K., P. KUMP, M. NEČEMER, P. PELICON, I. ARČON, P. PONGRAC, B. POVH, H. BOTHE & M. REGVAR, 2009: *Micro-PIXE analysis for localisation and quantification of elements in roots of mycorrhizal metal-tolerant plants*. In: Symbiotic Fungi: Principles and Practice, Soil Biology, vol. 18. VARMA, A. & A. C. KHARKWAL (Eds.), Springer-Verlag (Berlin), str. 227-242.
- VOGEL-MIKUŠ, K., P. PONGRAC & P. PELICON, 2014: *Micro-PIXE elemental mapping for ionome studies of crop plants*. International Journal of PIXE 24(3) (Singapore), str. 217-233.
- VOGEL-MIKUŠ, K., I. ARČON, P. KUMP, P. PELICON, M. NEČEMER, P. VAVPETIČ, Š. KOREN & M. REGVAR, 2012: *Analytical tools for exploring metal accumulation and tolerance in plants*. In: Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants. ANJUM, N. A. (Ed), Taylor & Francis (Abingdon on Thames), str. 443-495.
- WHITE, P. J. & M. R. BROADLEY, 2009: *Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine*. New Phytologist 182 (Hoboken), str. 49-84.
- WHITE, P. J., H. C. BOWEN, E. FARLEY, E. K. SHAW, J. A. THOMPSON, G. WRIGHT & M. R. BROADLEY, 2015: *Phylogenetic effects on shoot magnesium concentration*. Crop & Pasture Science 66(12) (Clayton), str. 1241-1248.
- WU, B. & J. S. BECKER, 2012: *Imaging techniques for elements and element species in plant science*. Metallomics 4 (London), str. 403-416.

Table 1. Phosphorus (P) and magnesium (Mg) concentration ratios in grain, seed, tubers, sprouts and leaves of some crop plant species.

Tabela 1. Razmerja med koncentracijami fosforja (P) in magnezija (Mg) v zrnju, semenih, gomoljih, kalčkih in listih nekaterih kmetijskih rastlin.

<i>Plant species</i>	<i>Plant part</i>	<i>P/Mg ratio</i>	<i>Reference</i>
Rice <i>Oryza sativa</i> L. n=1755 genotypes [flooded] n=1729 genotypes [unflooded]	Grain	Flooded: 2.4 Unflooded: 2.5	PINSON et al. 2015
Pearl millet <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br. n=225 genotypes	Grain	3	BASHIR et al. 2014
Wheat <i>Triticum aestivum</i> L. n=1 genotype	Grain	2.8	PONGRAC et al. 2016a
Common buckwheat <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench n=1 genotype	Grain	1.4	PONGRAC et al. 2016b
Tartary buckwheat <i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn n=1 genotype	Grain	1.8	PONGRAC et al. 2016a, b
Quinoa <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. n=7 genotypes	Grain	1.1 – 2.2	PRADO et al. 2014
Lentil <i>Lens culinaris</i> Medik. n=39 genotypes	Seed	3.9	KARAKÖY et al. 2012
Pea <i>Pisum sativum</i> L. n=481 genotypes	Seed	3.1	GRUSAK 2002*

Chickpea <i>Cicer arietinum</i> L. n=239 genotypes	Seed	2.6	GRUSAK 2006*
Potato <i>Solanum tuberosum</i> L. n=21 genotypes	Tubers	1.3	KÄRENLAMPI & WHITE 2009
Wheat <i>Triticum aestivum</i> L. n=1 genotype	Sprouts	Tap water: 5 High-Mg solution**: 3.5	PONGRAC et al. 2016a
Tartary buckwheat <i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn. n=1 genotype	Sprouts	Tap water: 1.2 High-Mg solution**: 0.8	PONGRAC et al. 2016a
Spinach <i>Spinacia oleracea</i> L. n=327 genotypes	Leaves	0.78	GRUSAK 2003*
Cabbage, kale, broccoli, cauliflower, Brussels sprouts <i>Brassica oleracea</i> L. n=260 genotypes	Leaves	Low-P soil: 0.3 High-P soil: 0.5	BROADLEY et al. 2008, BROADLEY et al. 2010
Potato <i>Solanum tuberosum</i> L. n=21 genotypes	Leaves	0.5	KÄRENLAMPI & WHITE 2009

*Data for chickpea, pea and spinach genotypes was obtained from the Germplasm Resources Information Network (GRIN) website (<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/descriptors.aspx?>). **High-Mg solution contained 5.6-times greater Mg concentration than tap water.

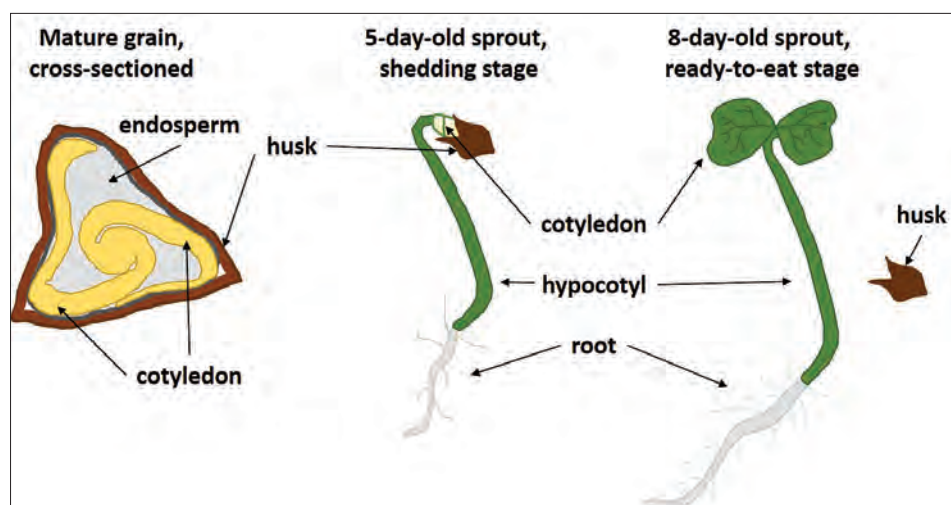


Figure 1. Development of Tartary buckwheat from seed to sprouts.
Slika 1. Razvojne faze tatarske ajde - od semena do kalice.

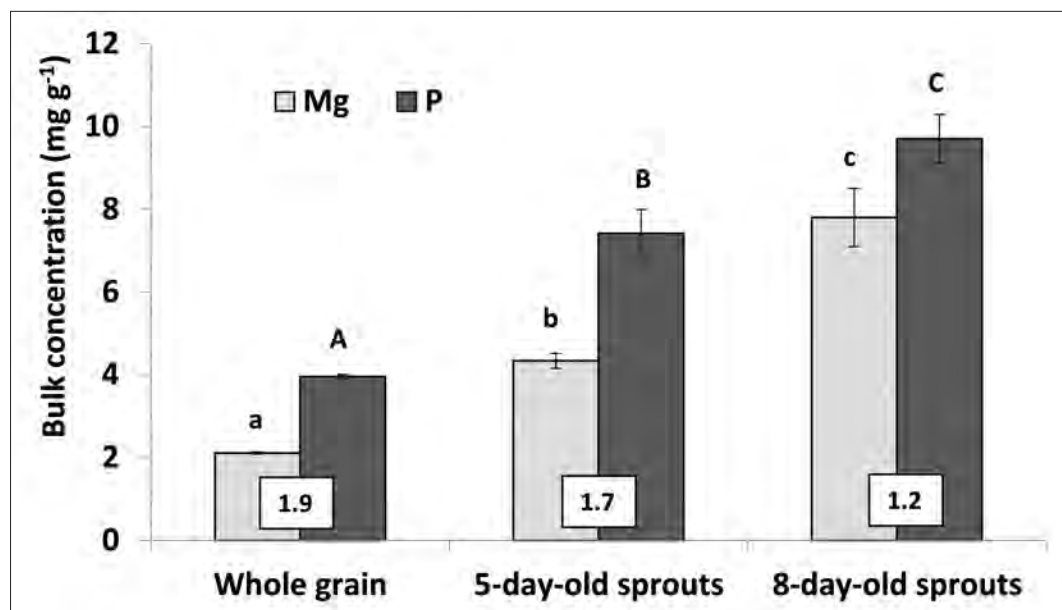


Figure 2. Bulk concentrations (mg g^{-1} dry matter) of magnesium (Mg) and phosphorus (P) in grain and sprouts of Tartary buckwheat and P/Mg concentration ratio (in squares). Shown are means ($n=3$ for each developmental stage) and standard deviations. Different letters above columns indicate statistical differences for each mineral element separately (Student-Newman-Keuls post-hoc test at $p<0.05$).

Slika 2. Skupne koncentracije (mg g^{-1} suhe snovi) magnezija (Mg) in fosforja (P) v zrnju in kalicah tatarske ajde in razmerje med koncentracijama P in Mg (podano v kvadratih na stolpcih). Prikazana so povprečja ($n=3$ za vsako razvojno fazo) in standardne deviacije. Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike za vsak posamezen mineralni element (Student-Newman-Keuls post-hoc test, $p<0.05$).

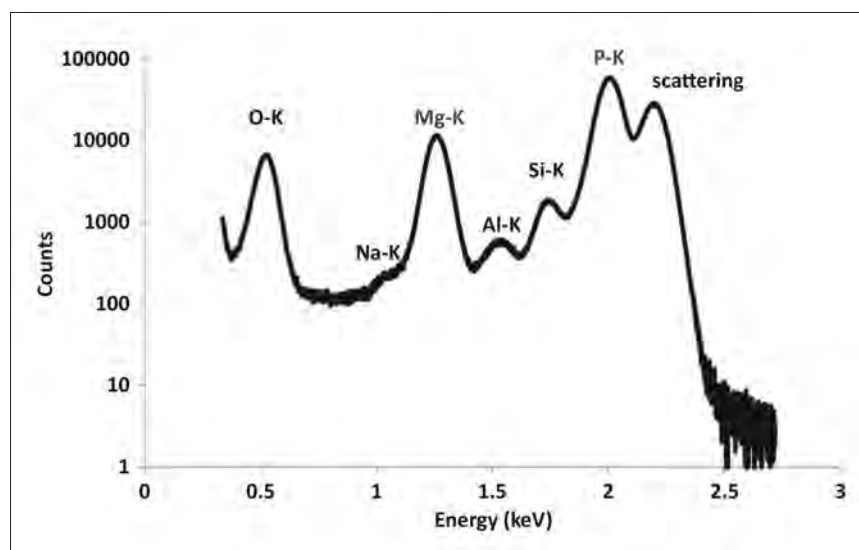


Figure 3. X-ray fluorescence sum spectrum (66 x 66 pixels) of the cross-sectioned cotyledon of a 8-day-old sprout (Figure 5) recorded at the TwinMic beamline, synchrotron Elettra, Trieste, Italy. Excitation energy was 2200 eV. The spectrum was extracted with PyMCA software (Solé et al. 2007). Characteristic K-lines are shown together with scattering peak.

Slika 3. Skupni rentgensko fluorescenčni spekter (vsota intenzitet rentgenskih fluorescenčnih črt na matriki velikosti 66 x 66 slikovnih pik) posnet na prečnem prerezu kličnega lista osem dni stare kalice na žarkovni liniji TwinMic na sinhrotornu Elettra v Trstu, Italija. Vzbujevalna energija je bila 2200 eV. Spekter je bil izrisan s programsko opremo PyMCA (Solé et al. 2007). Prikazani so vrhovi karakterističnih K-črt in sipanje.

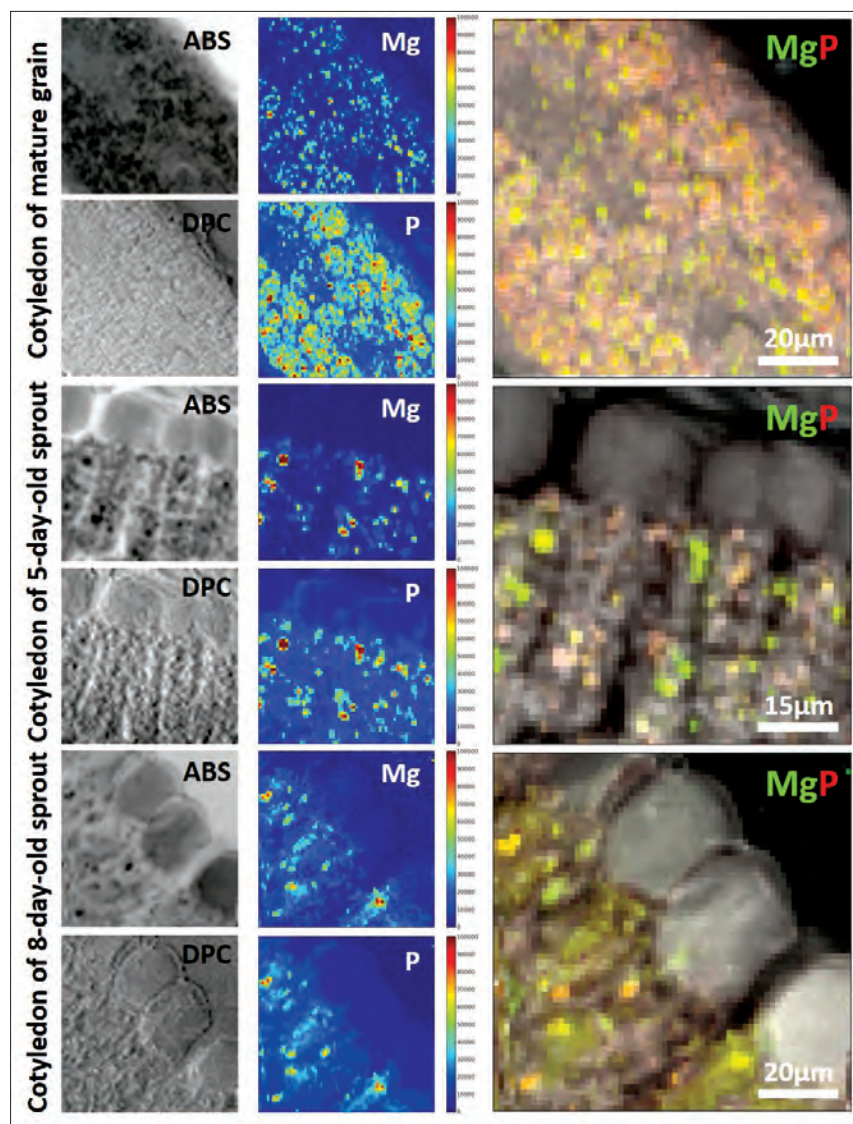


Figure 4. X-ray imaging of structural make-up (left panels), quantitative distributions of magnesium (Mg) and phosphorus (P) (middle panels) and co-localisation images (right panels) of Tartary buckwheat cotyledons. Representative sample from $n=3$ for each developmental stage is shown. Structure of cotyledons is indicated with absorption (ABS) and differential phase contrast (DPC) images. In co-localisation images, co-localisation of Mg (shown in green) and P (shown in red) is indicated as yellow (a mix of red and green).

Slika 4. Slika anatomskih lastnosti (levi del slike), kvantitativne razporeditve magnezija (Mg) in fosforja (P) (srednji del slike) in kolokalizacije Mg in P (desni del slike) v kličnih listih tatarske ajde. Za vsako razvojno stopnjo je prikazan izbran vzorec izmed treh analiziranih tkivnih rezin. Anatomske lastnosti kotiledona so prikazane na sliki posneti v načinu absorpcije rentgenskih žarkov (ABS) in diferencialnega faznega kontrasta rentgenskih žarkov (DPC). Na kolokalizacijskih slikah je Mg prikazan z zeleno, P pa z rdečo barvo. Njuno mešanje, torej prisotnost obeh mineralnih elementov na posamezni slikovni piki, je prikazano z rumeno barvo.

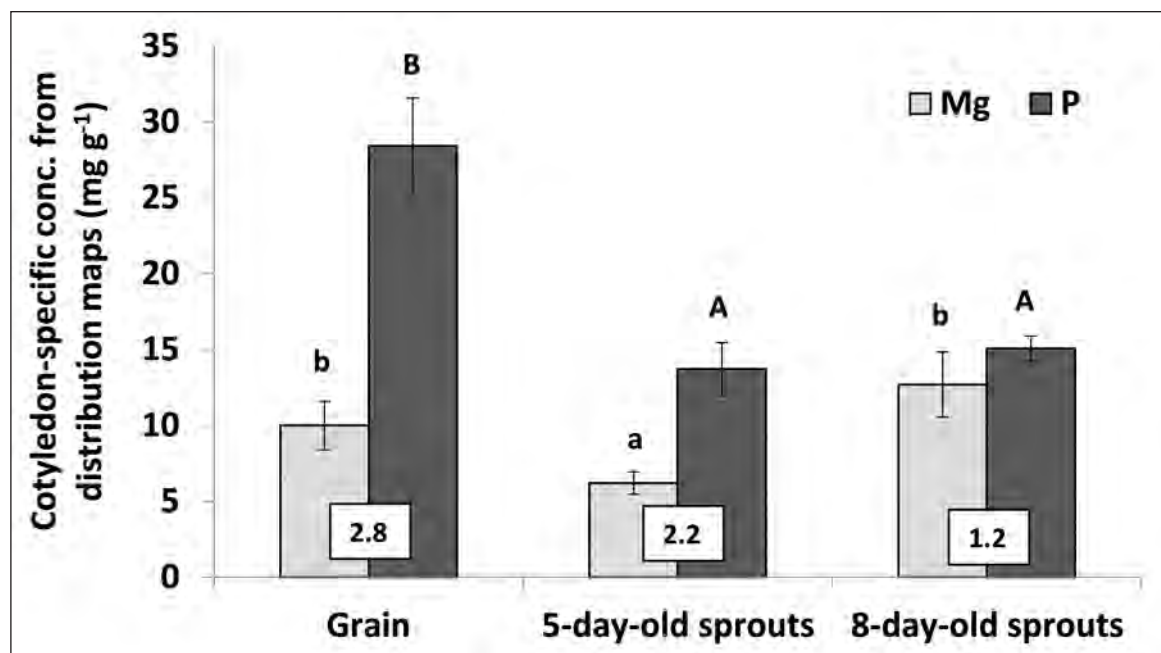


Figure 5. Cotyledon-specific concentrations (mg g^{-1} dry matter) of magnesium (Mg) and phosphorus (P) in grain and sprouts of Tartary buckwheat and their P/Mg concentration ratio (in squares). Concentrations were extracted from quantitative distribution maps (representative maps are shown in Figure 4) using ImageJ software (Abràmoff et al. 2004; Vogel-Mikuš et al. 2014). Means ($n=3$ for each developmental stage) and standard deviations are shown. Different letters above columns indicate statistical differences for each mineral element separately (Student-Newman-Keuls post-hoc test at $p<0.05$).

Slika 5. Koncentracije (mg g^{-1} suhe snovi) magnezija (Mg) in fosforja (P) v kličnih listih v zrnu in kalicah tatarske ajde in razmerje koncentracij P in Mg (podano v kvadratih na stolpcih). Koncentracije so bile pridobljene iz kvantitativnih map razporeditve P in Mg (ena izmed slik je prikazan na Sliki 4) s pomočjo programske opreme ImageJ (Abràmoff et al. 2004; Vogel-Mikuš et al. 2014). Prikazana so povprečja ($n=3$ za vsako razvojno stopnjo) in standardni odkloni. Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike za vsak posamezen mineralni element (Student-Newman-Keuls post-hoc test pri $p<0.05$).

SELEN V RASTLINAH IN V OKOLJU V SLOVENIJI

SELENIUM COMPOUNDS IN PLANTS AND IN BIOSPHERE IN SLOVENIA

Vida Škrabanja¹

Delo je prispelo 27. novembra 2016, sprejeto 31. decembra 2016.
Received November 27, 2016; accepted December 31, 2016.

IZVLEČEK

Selen v rastlinah in v okolju v Sloveniji

V Sloveniji so tla s selenom revna in je možnost pomanjkanja selena v prehrani nekaterih skupin prebivalstva (starejši, vegetarijanci) visoka. Gojenje rastlin, obogatenih s selenom, je učinkovit način dodajanja selena v vsakdanjo prehrano tistih, ki tega esencialnega elementa ne prejmejo v zadostnih količinah. S prehranskega vidika so s selenom obogatena živila, predvsem rastlinskega izvora, potencialni vir selena, ki se vnaša v organizme živali in ljudi preko prehranske verige in se s kompleksnimi pretvorbami na molekularnem nivoju pretvarja iz anorganskih v bolj razpoložljive organske oblike. V prispevku so zbrani rezultati raziskovanja vsebnosti selena v posameznih rastlinskih vrstah ter različnih načinov sistematičnega dodajanja selena za doseg višje koncentracije le-tega v pridelku. V delu je poudarek namenjen pregledu objavljenih del domačih strokovnjakov, ki so v Sloveniji raziskovali vsebnost selena in sposobnost njegove akumulacije v rastlinah, pri čemer so fiziološke lastnosti in pridelek rastlin dodatno narekovali spremenljivi okoljski dejavniki.

Gljučne besede: Slovenija, selen, rastlinski viri, prehranski vnos, dodatek selena, okolje

ABSTRACT

Selenium compounds in plants and in biosphere in Slovenia

Selenium occurs ubiquitously in the environment and actively circulates in the biosphere. In Slovenian soil, low concentrations of selenium were detected, and the possibility of selenium deficiency in the diet of certain groups of the population (elder people, vegetarians) is high. From a nutritional point of view, the selenium-enriched foods, including foods of plant origin, is a potential source of selenium for humans. Selenium is introduced into the organism of animals and humans via the food chain, and the complex transformations at the molecular level translates selenium into more available organic forms. An effective way of adding selenium to the daily diet for those who do not receive this essential element in sufficient quantities is through cultivated plants enriched with selenium. The article summarizes the results of a systematic survey of selenium content in various plant species, including different ways of adding selenium to achieve a higher concentration of the same in the crops. In part, published works of Slovenian scientists who have studied the selenium content in Slovenian plant samples are reviewed. The impact of various environmental parameters, including selenium fertilization on bioaccumulation of the same in plants, on their physiological characteristics and yield is also discussed.

Keywords: Slovenia, selenium, plant sources, dietary intake, selenium supplementation, environment

¹ doc.dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana; e-mail: vida.skrabanja@guest.arnes.si

1 UVOD

Selen je eden izmed približno 60 esencialnih hranil, potrebnih za človekovo zdravje (HATFIELD s sod. 2012). V zadnjih 200 letih od njegova odkritja so strokovnjaki temeljito proučevali vlogo seleno z biokemijskega, molekulskega in genetskega zornega kota. Številne študije obravnavajo vpliv pomanjkanja ali presežka seleno v dietah na živalskih modelih ali s kliničnimi študijami pri ljudeh.

Identifikacija in koncentracija določene kemijske oblike, v kateri je selen prisoten, sta ključni za opis molekularnih mehanizmov biološke aktivnosti tega elementa in upodobitev/karakterizacijo specifičnih presnovnih poti v celicah in tkivih. Omenjeni procesi so predmet medicinskih, fizioloških in prehranskih raziskav predvsem z vidika:

- kroženja in akumulacije seleno v okolju,
- akumulacije seleno v vodnih in gojenih rastlinah,

- vloge seleno v zdravju in bolezni,
- presnove in aktivnosti terapevtskih molekul in nanodelcev, ki vsebujejo selen,
- živil in krmil, obogatenih s selenom in/ali pridobljenih z biotehnološkimi postopki,
- biološke uporabnosti in presnove seleno v živilih,
- onesnaženja okolja in zlasti vodotokov z ostanki presnove seleno pri živalih in ljudeh.

Primeren prehranski status je nujno potreben za človekovo zdravje, predvsem zaradi njegove vključenosti v celično presnovo preko pomembnih fizioloških procesov, kot je sinteza selenocisteina, koencima Q, glutation peroksidaze in tioredoksin reduktaze (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE 2008, RAHMAN-TO & DAVIES 2012). Velike koncentracije seleno v okolju so lahko problematične, selen v prehrani pa je v velikih odmerkih lahko strupen za ljudi.

2 POSLEDICE ODPSTOPANJ OD PRIPOROČENIH VREDNOSTI DNEVNEGA VNOSA SELENA S HRANO

Selen je esencialni element za mnogo živalskih vrst, tudi za človeka. Aktivnost je odvisna od kemijske oblike. Z vgradnjo v različne beljakovine vpliva na rast in razvoj organizma ter je vključen v zaščito tkiv pred oksidativnimi procesi in zaščito pred okužbami. Premalo zaužitega seleno (manj kot 13 do 19 µg/dan) pri človeku sproži resne posledice in vodi v motnje in bolezni, kot so vrtoglavica, slabost, izguba apetita, srčno popuščanje, srčne aritmije in povečanje srca. Bolezen, ki prizadene predvsem otroke in nosečnice, so poimenovali Keshanova bolezen. Druga poznana bolezen, ki je povezana s premajhnim dnevnim vnosom seleno, je Kashin Beckova bolezen. To je bolezen povečanih sklepov oziroma vrsta revmatoidnega stanja-osteoartritisa. Posledice bolezni so šibkost udov, okornost, otekanje in bolečine v prstnih členkih, povečanje sklepov in

atrofija nekaterih progastih mišic. Drugi znaki pomanjkanja seleno pri ljudeh so poškodbe srčne mišice, trebušne slinavke, mišična distrofija, izguba lasnega in kožnega pigmenta (REILLY 2006, HATFIELD s sod. 2012, HATFIELD s sod. 2016).

Čeprav je v mikro količinah nujno potreben, lahko v visokih koncentracijah škoduje zdravju ljudi. Dolgotrajna izpostavljenost visokim koncentracijam pri ljudeh (nad 1000 µg/dan) ima genotoksične in kancerogene učinke, pri več kot 3200 µg/dan pa povzroča selenozo (REILLY 2006). Toksičnost se v hujših oblikah odraža v nenormalnem delovanju živčnega sistema in žlez z notranjim izločanjem (predvsem jetra), v moteni sintezi ščitničnih in rastnih hormonov kot tudi v porušeni presnovi inzulina podobnega rastnega faktorja (REILLY 2006).

3 SELEN V OKOLJU

V kemijskih lastnostih je selen podoben žveplu (REILLY 2006). V okolju je v anorganski obliki (elementarni selen: Se, selenid: Se⁻, selenit(IV): SeO₃²⁻, selenat(VI): SeO₄²⁻) in v organski obliki: predvsem kot metilirane selenove spojine, seleno-aminokislino in selenobeljakovine v bioloških sistemih (PYRZYŃSKA 2002, UDEN s sod. 2004). SHRIFT (1964) je predstavil obstoj kroženja

seleno v naravi, FROST (1972) pa dinamično ravnotežje in pretvarjanje med anorganskimi in organskimi oblikami seleno.

Količine anorganskih oblik seleno so v zemeljski skorji geografsko zelo neenakomerno razporejene in so v koncentracijah od skoraj nič do 1250 mg/kg (HATFIELD s sod. 2016). Z izjemo območij, kjer sežigajo fo-

silna goriva, kjer je postavljena steklarska industrija ali obsežna proizvodnja kemikalij in elektronike, je vnos selen in s tem vpliv na človekovo zdravje preko inhalacijskih poti neznan (WANG & GAO 2001).

Povprečna koncentracija selen in v zemlji in v tleh je mnogo večja na območjih s sedimentnimi kameninami v primerjavi s tistimi z vulkansko podlago. Področja, kjer je koncentracija selen in v tleh zelo visoka, so v delih Wyominga, Severne in Južne Dakote v Ameriki, v nekaterih predelih Kitajske, Rusije, Irske, Kolumbije in Venezuele. JOHNSON s sod. (2010) poroča o koncentraciji preko 600 mg v kilogramu črnega skrilavca. Določene rastline lahko iz selenom zelo bogate podlage akumulirajo tudi do 3 mg tega elementa na gram rastline. Take rastline običajno niso okusne in so potencialno toksične za pašno živino (COMBS 2001), v naravnem okolju pa visoka koncentracija selen in predstavlja zaščito rastlin pred herbivori (MECHORA & UGRINOVIĆ 2015).

Dodajanje natrijevega selenita mineralnim gnojilom ali živalski krmi je običajna praksa v državah, kjer so tla revna s selenom (WANG s sod. 1998, WATKINSON 1983). To velja predvsem za severozahodni Oregon, Finsko, Novo Zelandijo, centralno Srbijo in velik del afriške celine (NGO s sod. 1997). PIRC & ŠAJN (1997) navajata vsebnosti selen in v tleh v Sloveniji. Po njihovih podatkih le-ta znaša od manj kot 0,1 do 0,7 mg/kg, kar pomeni, da so tudi v Sloveniji tla revna s selenom.

V isti državi, tak primer je npr. Kitajska ali Avstralija, pa se lahko koncentracije selen in v tleh tudi regionalno zelo razlikujejo.

Topne oblike selen in v vodi so predvsem anorganski selenat in selenitni ioni. Pitna voda z običajnimi količinami selen in le malo doprinese k dnevni vnosu (DEVEAU 2010), pri čemer vrednosti variirajo od 0,12 do 0,44 µg/l (CUTTER 1989). Izjeme so zabeležili v ruralnem okolju jugovzhodnega Kolorada zaradi izrazite suše leta 1975 kot tudi v vodnih izvirih osrednje-zahodnega dela Združenih držav Amerike, pri čemer so bile vrednosti med 50 in 300 µg/l (HATFIELD s sod. 2012). Tudi VINCENTI s sod. (2010) navaja, da so v severni Italiji leta 1990 ugotovili neobičajno visoke količine selen in v vodovodni vodi. V podtalnici ali površinski vodi so količine selen in lahko zelo variabilne – geografsko pogojene, in sicer od 0,06 do 400 µg/l, v nekaterih primerih celo do 6000 µg/l (HATFIELD s sod. 2016). Ameriška regulativa oz. zvezni standardi v pitni vodi dopuščajo koncentracijo do 50 µg/l (HATFIELD s sod. 2012, HATFIELD s sod. 2016), ki je v primerjavi z Nemčijo (in drugimi evropskimi državami), kjer je zgornja meja v ustekleničeni vodi ali vodovodni vodi le do 10 µg/l, bistveno večja (HATFIELD s sod. 2016). Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je za selen v

pitni vodi določila priporočeno vrednost 10 µg/l, ki je izračunana na 10 % delež vnosa z vodo (NIJZ 2014). V slovenskem Pravilniku o pitni vodi je selen uvrščen v Prilogo I, del B, kjer je določena mejna vrednost v pitni vodi 10 µg/l (ANONYMOUS 2004). Koncentracije v pitni vodi so različne in so geografsko pogojene; koncentracije so višje pri nizkem ali visokem pH zaradi večje topnosti v takem okolju (NIJZ 2014). Po objavljenih podatkih (SMRKOLJ s sod. 2006b) je selen v Ljubljani (odvzem na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete) v vodovodni vodi pod mejo detekcije, ki je 0,5 µg/l.

Posledica industrije in intenzivnega kmetijstva so odpadne vode, ki se stekajo neposredno ali posredno v močvirja, jezera in reke. Ker organizmi v vodnih sistemih zlahka privzemajo selen, lahko koncentracije le-tega hitro dosežejo vrednosti, ki so toksične za ribe ter prosto živeče živalske in rastlinske vrste. Pri ribah velike koncentracije selen in povzročajo poškodbe tkiv, motnje pri razmnoževanju ali celo izumrtje celotne vrste (LEMLY & SMITH 1987). Zanimiva je študija PENGGLASE s sod. (2014), ki so ugotovili, da lahko povečane količine selen in v prehrani rib zmanjšajo škodljiv vpliv živega srebra na rast in preživetje odraslih rib, hkrati pa v kombinaciji z živim srebrom sinergistično negativno vplivajo na njihovo razmnoževanje.

Znanstveniki in regulatorne oblasti namenjajo veliko pozornost selenu kot enemu izmed onesnaževalcev okolja. Stopnja mobilnosti oziroma hitrost kroženja selen in v ekosistemu v veliki meri določa, ali se bo toksičnost pojavila in koliko časa bo tveganje v okolju trajalo. Ko selen vstopi v ekosistem, ga organizmi zaužijejo ali absorbirajo, lahko se veže ali kompleksira z drugimi snovmi ali pa ostane prosto raztopljen v vodi. Vodni organizmi so sposobni akumulirati selen v koncentracijah, ki so bistveno večje kot v njihovem okolju ali hrani. Bioakumulacija v takem obsegu je možna predvsem zato, ker je selen kemijsko podoben žveplu in ker je esencialno mikrohranilo. Ta sposobnost je morda najpomembnejši dejavnik pri kroženju selen in v vodnem okolju (LEMLY 1997). Pomembnejše raziskave glede odziva različnih makrofitov oziroma vodnih organizmov (navadni rogolist *Ceratophyllum demersum*, klasasti rmanec *Myriophyllum spicatum*, preraslostni dristavec *Potamogeton perfoliatus*, vodni jetičnik *Veronica anagallis-aquatica*, vodni mah *Fontinalis antipyretica*, mala vodna leča *Lemna minor* L., ozkolistni košček *Berula erecta*) so objavili v mnogih delih slovenski avtorji (MECHORA s sod. 2011, MECHORA s sod. 2012b, MECHORA & VRHOVŠEK 2012, MECHORA s sod. 2013, MECHORA s sod. 2014a, MECHORA s sod. 2015, MECHORA & KANDUČ 2016, MECHORA s sod. 2016).

V morski vodi zasledimo selen v manjših količinah (od 0,09 do 0,11 µg/l). Živa bitja, vključno s proka-

riionskimi celicami, z algami, morsko travo, nevretenčarji in vretenčarji, so sposobni ta mineral akumulirati. Tako so tudi ti organizmi vir selen za človeka, ki ga

človek vnese v telo preko prehranske verige (HATFIELD s sod. 2012).

4 SELEN V GOJENIH RASTLINAH

Absolutne vrednosti koncentracij selen so v rastlinah lahko zelo variabilne. WOLF & GOLDSCHMIDT (2007) sta raziskovala vsebnost selen v vzorcih pšenice. Ugotovila sta, da je prevladujoča oblika selen v pšenici selenometionin (okrog 55%), v znatnih količinah (do 20%) pa je tudi selenocisteina in selenita/selenata. Pomemben zaključek iz analiz je, da je skupna vrednost selen zaradi geografskih razlik ali načina gnojenja variirala kar za faktor 500, delež selenometionina pa je v vseh primerih ostajal konstanten, t.j. okrog 55% glede na skupno vrednost selen. Avtorja nakazujeta, da so v rastlinah mehanizmi, ki regulirajo tip in količino določene kemijske oblike selen.

Biološka uporabnost ali biorazpoložljivost pove, kolikšen delež hrana pride v krvni obtok. Biorazpoložljivost selen je v korelaciji z virom in kemijsko obliko, v kateri je ta prisoten v živilu (FINLEY 2006, REEVES s sod. 2005). Razmere v okolju in kmetijska praksa zelo vplivajo na vsebnost selen pri mnogih rastlinah. Gojenje rastlin, obogatenih s selenom, je učinkovit način dodajanja selen v vsakdanjo prehrano tistih, ki tega esencialnega elementa ne prejmejo v zadostnih količinah. WANG s sod. (1995) ugotavljajo, da se je zaradi rednega dodajanja natrijevega selenata gnojilo v koncentraciji 16 mg/kg za pridelavo žit in 6 mg/kg za pridelavo krme dnevni vnos selen pri Fincih povečal z 39 na 110 µg na dan.

Pregled elementov v sledovih (Se, Zn, Fe, Co, Ni, Rb, Sb, Ag, Hg, Cr, Sn) in njihovo razporeditev v rastlinah in mlevskih frakcijah navadne (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) so objavili BONAFACCIA s sod. (2003). Številne raziskave o količini selen pri navadni in tatarski ajdi kažejo na sposobnost teh rastlin za akumulacijo selen kot tudi vpliv le-tega v kombinaciji z nekaterimi drugimi okoljskimi dejavniki na biokemijske procese v rastlini. O povišani vsebnosti selen v rastlinah ajde, zraslih na tleh, ki so bila pognojena z različnimi koncentracijami vodnih raztopin natrijevega selenata, poročajo GOLOB s sod. (2015). Večji vpliv dodatka selen in možnost vzgoje ajde v smislu varnega funkcionalnega živila se je izkazal pri tatarski ajdi.

Tudi z listnim škropljenjem oz. dodajanjem selen v obliki natrijevega selenata različnih koncentracij v času cvetenja se je koncentracija selen v različnih

delih ajde povečala, v največji meri v zrnju (VOGRINČIČ s sod. 2009, STIBILJ s sod. 2004, GOLOB s sod. 2016c), glede na vrsto pa v tatarski ajdi (GOLOB s sod. 2015). O večji koncentraciji selen v potomkah rastlin tatarske ajde, ki je bila v prvi generaciji škropljena z natrijevim selenatom, poročajo GOLOB s sod. (2016a).

Listno škropljenje v času cvetenja ajde v kombinaciji s posnemanjem sprememb različnih okoljskih dejavnikov, kot je pomanjkanje vode, obsevanje rastlin z UV-B žarki ali sočasno listno škropljenje z natrijevim sulfatom, je vplivalo tako na vsebnost selen v rastlinah kot tudi na presnovne procese v rastlinah (SMRKOLJ s sod. 2006b, KREFT s sod. 2013) in posledično na biomaso (BREZNIK s sod. 2005, TADINA s sod. 2007, GOLOB s sod. 2016b).

Tretji način za obogatitev rastlin ajde s selenom, opisan v literaturi, je z namakanjem semen pred setvijo v različnih koncentracijah natrijevega selenata-Se(VI), natrijevega selenita-Se(IV) in selenometionina-SeMet. Privzem selen je odvisen od kemijske oblike selen in koncentracije v raztopini. Glede na obliko selen si rezultati za privzem selen sledijo v vrstnem redu: Se(VI) > SeMet > Se(IV) (OŽBOLT s sod. 2008, CUDERMAN s sod. 2010).

Vpliv dodanega selen na fiziološke lastnosti in pridelek z vidika spremenjenih presnovnih procesov, kot so fotokemična učinkovitost fotosistema II in respiratorni potencial, so GERM s sod. (2014) raziskovali pri fižolu, SMRKOLJ s sod. (2006a) pri grahu, GERM s sod. (2007) pri radiču, GERM & OSVALD (2007) v rukoli, GERM s sod. (2007) pri krompirju, STIBILJ s sod. (2004), SMRKOLJ s sod. (2005b) ter GERM s sod. (2005) pri bučah, MECHORA s sod. (2011), MECHORA s sod. (2012a) ter MECHORA s sod. (2014b) pri rdečem zelju. S prehranskega vidika so vsa ta živila potencialni vir selen, ki se vnaša v organizem preko prehranske verige in se s kompleksnimi pretvorbami na molekulskem nivoju pretvarja iz anorganskih v organske oblike.

Enako, kot v že omenjeni študiji WOLFA & GOLDSCHMIDTA (2007), ki sta pri pšenici ugotovila, da je prevladujoča oblika selen selenometionin, potrjujejo tudi raziskave v različno tretiranih vzorcih ajde (93% - SMRKOLJ s sod. 2006b), buč (81% - SMRKOLJ s sod., 2005b), ječmena in rži (70-83% - STADLOBER s sod. 2001).

Sadje in zelenjava, pridelana na podlagi z nizko vsebnostjo selen, vsebujeta le neznatne količine selen, npr. paradižnik vsebuje manj kot 0,1 µg/100 g tega elementa, šparglji 2,3 µg/100 g in limski fižol 7,2 µg/100 g. Nekatere rastline so sposobne akumulirati selen. EDMONDS & MORITA (2000) sta pri čebuli, divjem poru, česnu in brokoliju določila kar 50-kratno večjo vsebnost selen v rastlinah, gojenih na podlagi, obogateni s selenom. Fox s sod. (2005) poročajo o visokih koncentracijah selen v česnu, ki je po njihovih analizah znašala kar 1355 µg/100 g.

Različni viri (HATFIELD s sod. 2012) navajajo, da lahko prevladujočo obliko selen, ki je selenometionin, zamenja višja koncentracija selen-metilselenocisteina in γ-glutamil-selen-metilselenocisteina. Več kot 40% selen-metilselenocisteina zasledimo v brokoliju. Med rastlinskimi viri, ki lahko akumulirajo večje količine selen, so še različne vrste alg, križnice (družina *Brassica*) in brazilski oreščki. Ti vsebujejo kar 1470-1917 µg/100 g, pri čemer je večina v obliki selenometionina. Glive, kot so gobe in kvasovke, lahko selen akumulirajo v večjih količinah in v več kot 20 različnih seleno-spojinah, anorganskih ali organskih, kot so npr. selenocistein, selenometionin, selen-metilselenocistein in selen-adenozilselenohomocistein.

Vsebnost selen v krmi in travi je odvisna od količine selen v zemlji, ta pa v nadaljevanju določa razlike v koncentracijah selen v mesu živali. Selen, ki ga preko rastlinske krme zaužije živali, v veliki meri vpliva na rast, prirejo in zdravje živali. Dostopnost selen v zadostnih količinah v prehrani živine zagotavlja normalno delovanje njihovega imunskega sistema in reprodukcije. Večje vsebnosti selen v krmi posredno vplivajo tudi na večje koncentracije le-tega v mleku in mesu, ki ga zaužije človek (MEHDI & DUFRASNE 2016).

Vpliv dodanega selen v krmo na vsebnost selen v mesu so proučevali SMRKOLJ s sod. (2003). Krmni obrok je vseboval različne količine selen (0,4 mg Se/dan oz. 4,4 mg Se/dan). Ob manjšem dodatku selen h krmi so določili od 3,3 do 3,9 µg selen in od 13 do 15 µg selen (v obeh primerih merjeno na 100 g svežega vzorca), ko je bila krma bogatejša s selenom.

SMRKOLJ s sod. (2005a) so ugotavljali tudi vsebnost selen v ribah, kjer ga je 15,3-68,6 µg/100 g, v piščančjem mesu 9,7-15,4 µg/100 g in v puranjem mesu 9,9-11,6 µg/100 g.

Jajca v povprečju vsebujejo 26 µg selen v 100 g vzorca. Z dodatkom selen h krmni mešanici za kokoši je možno vsebnost selenometionina in selenocisteina v jajcih močno povečati (SUN & FEN 2011).

5 POVZETEK

Rezultati številnih raziskav potrjujejo, da je selen esencialni element v sledovih, ki je navzoč praktično povsod v okolju, vendar v različnih količinah glede na geografsko območje. Znanstvene objave, vključene v tem pregledu, kažejo na velik napredek v znanju in razumevanju biološke vloge selen in njegove pomembnosti v prehrani človeka. Selen vstopa v prehransko veri-

go iz zemlje, posledično vpliva na rast rastlin ter s tem tudi na kakovost rastlinskih in živalskih pridelkov. Znanih je več načinov, kako učinkovito obogatiti prehranske vire s selenom, pri čemer je zaradi ozke meje med prenizkim in previsokim vnosom selen potrebna skrajna previdnost.

6 SUMMARY

Selenium is considered as an essential trace element and has been found in different environmental compartments. Geographically, it is unevenly distributed and concentrations of the selenium both within and between countries may vary significantly. Scientific publications reviewed in this paper indicate a considerable progress in the knowledge and understanding of the biological role of selenium in plants and its close relation with human health. Diet is the major source of selenium for humans and the intake of this essential

element depends on its concentration in food and amount of food consumed. Selenium distribution and availability in plants, their growth and thereby also the quality of the crop and livestock products are directly affected by selenium levels in the soil. There are several ways how to enrich the nutritional sources of selenium, whereby due to the narrow concentration range between essentiality and toxicity of selenium extreme caution is needed.

7 LITERATURA - REFERENCES

- ANONYMOUS, 2004: *Pravilnik o pitni vodi*. Uradni list RS 19/2004.
- BONAFACCIA, G., L. GAMBELLI, N. FABIAN & I. KREFT, 2003: *Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat*. Food Chemistry (Amsterdam) 83 (1): 1-5.
- BREZNIK, B., M. GERM, A. GABERŠČIK & I. KREFT, 2005: *Combined effects of elevated UV-B radiation and the addition of selenium on common (Fagopyrum esculentum Moench) and tartary [Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn.] buckwheat*. Photosynthetica (Praga) 43 (4): 583-589.
- COMBS, G. F., 2001: *Selenium in global food systems*. British Journal of Nutrition (Cambridge) 85 (5): 517-547.
- CUDERMAN, P., L. OŽBOLT, I. KREFT & V. STIBILJ, 2010: *Extraction of Se species in buckwheat sprouts grown from seeds soaked in various Se solutions*. Food Chemistry (Amsterdam) 123 (3): 941-948.
- CUTTER, G. A., 1989: *Freshwater systems*. V: Ihnat, M. (ur.): Occurrence and Distribution of Selenium. FL: CRC Press Inc. (Boca Raton): 243-262.
- DEVEAU, M., 2010: *Contribution of drinking water to dietary requirements of essential metals*. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A. (London) 73 (2): 235-241.
- EDMONDS, J. S. & M. MORITA, 2000: *The identification of selenium species in biological samples*. Applied Organometallic Chemistry (Berlin) 14 (3): 133-145.
- FINLEY, J. W., 2006: *Bioavailability of selenium from foods*. Nutrition Reviews (Oxford) 64 (3): 146-151.
- FOX, T. E., C. ATHERTON, J. R. DAINTY, D. J. LEWIS, N. J. LANGFORD, M. J. BAXTER, H. M. CREWS & S. J. FAIRWEATHER-TAIT, 2005: *Absorption of selenium from wheat, garlic, and cod intrinsically labeled with Se-77 and Se-82 stable isotopes*. International Journal for Vitamin and Nutrition Research (Boston) 75 (3): 179-186.
- FROST, D. V., 1972: *The two faces of selenium – can selenophobia be cured?* CRC Critical Reviews in Toxicology (Berlin) 1 (4): 467-514.
- GERM, M., I. KREFT & J. OSVALD, 2005: *Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (Cucurbita pepo L.)*. Plant Physiology and Biochemistry (Amsterdam) 43: 445-448.
- GERM, M., I. KREFT, V. STIBILJ & J. OSVALD, 2014: *The effect of selenium on yield and primary terminal electron transport system activity in two cultivars of bean plants Phaseolus vulgaris*. Acta Biologica Slovenica (Ljubljana) 57 (2): 3-12.
- GERM, M., I. KREFT, V. STIBILJ & O. URBANČ-BERČIČ, 2007: *Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato*. Plant Physiology and Biochemistry (Amsterdam) 45: 162-167.
- GERM, M. & J. OSVALD, 2005: *Selenium treatment affected respiratory potential in Eruca sativa*. Acta Agriculturae Slovenica (Ljubljana) 85 (2): 329-335.
- GERM, M., V. STIBILJ, J. OSVALD & I. KREFT, 2007: *Effect of selenium foliar application on chicory (Cichorium intybus L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry (München) 55 (3): 795-798.
- GOLOB, A., M. GERM, I. KREFT, I. ZELNIK, U. KRISTAN & V. STIBILJ, 2016a: *Selenium uptake and Se compounds in Se-treated buckwheat*. Acta Botanica Croatica (Zagreb) 75 (1): 17-24.
- GOLOB, A., D. GADŽO, V. STIBILJ, M. DJIKIĆ, T. GAVRIĆ & M. GERM, 2016b: *Addition of Se affected concentration of Se in the second generation of tartary buckwheat plants*. Folia Biologica et Geologica (Ljubljana) 57 (1): 87-92.
- GOLOB, A., D. GADŽO, V. STIBILJ, M. DJIKIĆ, T. GAVRIĆ, I. KREFT & M. GERM, 2016c: *Sulphur interferes with selenium accumulation in tartary buckwheat plants*. Plant Physiology and Biochemistry (Amsterdam) 108: 32-36.
- GOLOB, A., V. STIBILJ, I. KREFT & M. GERM, 2015: *The feasibility of using tartary buckwheat as Se-containing food material*. Journal of Chemistry (Hindawi) (Online): 1-4.
- HATFIELD, D. L. (ur.), M. J. BERRY (ur.) & N. V. GLADYSHEV (ur.), 2012: *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. 3. izdaja. New York.
- HATFIELD, D. L. (ur.), U. SCHWEIZER (ur.), P. A. TSUJI (ur.) & N. V. GLADYSHEV (ur.), 2016: *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health*. 4. izdaja. New York.
- JOHNSON, C. C., F. M. FORDYCE & M. P. RAYMAN, 2010: *Symposium on »Geographical and geological influences on nutrition«: Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition*. Proceedings of the Nutrition Society (Cambridge) 69 (1): 119-132.
- KREFT, I., Š. MECHORA, M. GERM & V. STIBILJ, 2013: *Impact of selenium on mitochondrial activity in young tartary buckwheat plants*. Plant Physiology and Biochemistry (Amsterdam) 63: 196-199.

- KROFLIČ, A., M. GERM, Š. MECHORA & V. STIBILJ, 2016a: *Selenium and its compounds in aquatic plant Veronica anagallis-aquatica*. Chemosphere (Oxford) 151: 296-302.
- LEMLY, A. D., 1997: *Environmental implications of excessive selenium: A review*. Biomedical and Environmental Sciences (Duluth) 10: 415-435.
- LEMLY, A. D. & G. J. SMITH, 1987: *Aquatic cycling of selenium: Implications for fish and wildlife*. Fish and Wildlife Leaflet (Washington) 12: 1-10.
- MECHORA, Š., P. CUDERMAN, V. STIBILJ & M. GERM, 2011: *Distribution of Se and its species in Myriophyllum spicatum and Ceratophyllum demersum growing in water containing Se (VI)*. Chemosphere (Amsterdam) 84 (11): 1636-1641.
- MECHORA, Š., M. GERM & V. STIBILJ, 2012a: *Selenium compounds in selenium-enriched cabbage*. Pure and Applied Chemistry (Durham) 84 (2): 259-268.
- MECHORA, Š., M. GERM & V. STIBILJ, 2012b: *Selenium and its species in the aquatic moss Fontinalis antipyretica*. Science of the Total Environment (Amsterdam) 438: 122-126.
- MECHORA, Š., M. GERM & V. STIBILJ, 2014a: *Monitoring of selenium in macrophytes : the case of Slovenia*. Chemosphere (Amsterdam) 111: 464-470.
- MECHORA, Š. & T. KANDUČ, 2016: *Environmental assessment of freshwater ecosystems of the Sava River watershed and Cerkniško Lake, Slovenia, using the bioindicator species Fontinalis antipyretica : insights from stable isotopes and selected elements*. Isotopes in Environmental and Health Studies (London) 52 (3): 239-257.
- MECHORA, Š., M. SOTLER, A. URBANEK KRAJNC & J. AMBROŽIČ-DOLINŠEK, 2016: *How selenium affects Berula erecta*. Water, Air and Soil pollution (Dunaj) 227 (12): 1-12.
- MECHORA, Š., V. STIBILJ & M. GERM, 2013: *The uptake and distribution of selenium in three aquatic plants grown in Se(IV) solution*. Aquatic Toxicology (Amsterdam) 128/129: 53-59.
- MECHORA, Š., V. STIBILJ & M. GERM, 2015: *Response of duckweed to various concentrations of selenite*. Environmental science and pollution research international (Dunaj) 22 (4): 2416-2422.
- MECHORA, Š., V. STIBILJ, I. KREFT & M. GERM, 2014b: *The physiology and biochemical tolerance of cabbage to Se (VI) addition to the soil and by foliar spraying*. Journal of Plant Nutrition (London) 37 (13): 2157-2169.
- MECHORA, Š., V. STIBILJ, T. RADEŠČEK, A. GABERŠČIK & M. GERM, 2011: *Impact of Se (VI) fertilization on Se concentration in different parts of red cabbage plants*. International Journal of Food, Agriculture & Environment – JFAE (Helsinki) 9 (2): 357-361.
- MECHORA, Š. & K. UGRINOVIĆ, 2015: *Can plant – herbivore interaction be affected by selenium?* Austin Journal of Environmental Toxicology (Jersey City) 1 (1): 1-5.
- MECHORA, Š. & M. VRHOVŠEK, 2012: *Response of two submersed macrophytes Ceratophyllum demersum and Myriophyllum spicatum to selenium in water = Odziv dveh potopljenih vrst makrofitov Ceratophyllum demersum in Myriophyllum spicatum na selen v vodi*. Acta Biologica Slovenica (Ljubljana) 55 (1): 9-14.
- MEHDI, Y. & I. DUFRASNE, 2016: *Selenium in cattle: A review*. Molecules (Basel) 21 (4): 1-14.
- NAVARRO-ALARCON, M. & C. CABRERA-VIQUE, 2008: *Selenium in food and the human body: A review*. Science of the Total Environment (Amsterdam) 400 (1-3): 115-141.
- NGO, D. B., L. DIKASSA, W. OKITOLONDA, T. D. KASHALA, C. GERVY, J. DUMONT, N. VANOEVERVELT, B. CONTEMPRÉ, A. T. DIPLOCK, S. PEACH & J. VANDERPAS, 1997: *Selenium status in relation to iodine deficiency*. Tropical Medicine and International Health (Chichester) 2 (6): 572-581.
- NIJZ. OPISI kemijskih parametrov, ki jih najdemo v pitni vodi, 2014: Nacionalni inštitut za javno zdravje. Ljubljana.
- OŽBOLT, L., S. KREFT, I. KREFT, M. GERM & V. STIBILJ, 2008: *Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation*. Food Chemistry (Amsterdam) 110 (3): 691-696.
- PENGLASE, S., K. HAMRE & S. ELLINGSEN, 2014: *Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction*. Aquatic Toxicology (Amsterdam) 149: 16-24.
- PIRC, S. & R. ŠAJN, 1997: *Vloga geokemije v ugotavljanju kemične obremenitve okolja*. V: A. Lah (ur.), Kemizacija okolja in življenja - do katere meje? Projekt evropskega leta varstva narave 1995. Slovensko ekološko društvo (Ljubljana): 165-186.
- PYRZYŃSKA, K., 2002: *Determination of selenium species in environmental samples*. Microchimica Acta (Dunaj) 140 (1): 55-62.
- RAHMANTO, A. S. & M. J. DAVIES, 2012: *Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants*. IUBMB Life (Hoboken) 64 (11): 863-871.

- REEVES, P. G., P. D. LEARY, B. R. GREGOIRE, J. W. FINLEY, J. E. LINDLAUF & L. K. JOHNSON, 2005: *Selenium bioavailability from buckwheat bran in rats fed a modified AIN-93G torula yeast-based diet*. The Journal of Nutrition (Rockville) 135 (11): 2627-2633.
- REILLY, C., 2006: *Selenium in food and health*. 2. izdaja. New York.
- SHRIFT, A., 1964: *A selenium cycle in nature*. Nature (London) 201 (492): 1304-1305.
- SMRKOLJ, P., L. POGRAJC, C. HLASTAN-RIBIČ & V. STIBILJ, 2005: *Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium*. Food Chemistry (Amsterdam) 90 (4): 691-697.
- SMRKOLJ, P., V. STIBILJ, I. KREFT & M. GERM, 2006a: *Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se(VI) and various levels of UV-B radiation*. Food Chemistry (Amsterdam) 96 (4): 675-681.
- SMRKOLJ, P., M. GERM, I. KREFT & V. STIBILJ, 2006b: *Respiratory potential and Se compounds in pea (Pisum sativum L.) plants grown from Se-enriched seeds*. Journal of Experimental Botany (Oxford) 57 (14): 3595-3600.
- SMRKOLJ, P., V. STIBILJ, I. KREFT & E. KAPOLNA, 2005: *Selenium species determination in selenium-enriched pumpkin (Cucurbita pepo L.) seeds by HPLC-UV-HG-AFS*. Analytical Sciences (Tokio) 21 (12): 1501-1504.
- SMRKOLJ, P., S. ŽGUR & V. STIBILJ, 2003: *Selen v govejem mesu izbranih pasem*. Meso in mesnine (Slovenj Gradec) 4: 5-8.
- STADLOBER, M., M. SAGER & K. J. IRGOLIC, 2001: *Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals - identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS*. Food Chemistry (Amsterdam) 73 (3): 357-366.
- STIBILJ, V., I. KREFT, P. SMRKOLJ & J. OSVALD, 2004: *Enhanced selenium content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) and pumpkin (Cucurbita pepo L.) seeds by foliar fertilisation*. European Food Research and Technology (Heidelberg) 219 (2): 142-144.
- SUN, H. & B. FENG, 2011: *Speciation of organic and inorganic selenium in selenium-enriched eggs by hydride generation atomic fluorescence spectrometry*. Food Analytical Methods (New York) 4 (2): 240-244.
- TADINA, N., M. GERM, I. KREFT, B. BREZNIK & A. GABERŠČIK, 2005: *Effect of water deficit and selenium on common buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) plants*. Photosynthetica (Praga) 45 (3): 472-476.
- UDEN, P. C., H. T. BOAKYE, C. KAHAKACHCHI & J. F. TYSON, 2004: *Selective detection and identification of Se containing compounds - review and recent developments*. Journal of Chromatography (Amsterdam) 1050 (1): 85-93.
- VINCENTI, M., F. BONVICINI, M. BERGOMI & C. MALAGOLI, 2010: *Possible involvement of overexposure to environmental selenium in the etiology of amyotrophic lateral sclerosis: a short review*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità (Rim) 46: 279-283.
- VOGRINČIČ, M., P. CUDERMAN, I. KREFT & V. STIBILJ, 2009: *Selenium and its species distribution in above-ground plant parts of selenium enriched buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench)*. Analytical Sciences (Tokio) 25 (11): 1357-1363.
- WANG, Z. J. & Y. X. GAO, 2001: *Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments*. Applied Geochemistry (Amsterdam) 16 (11-12): 1345-1351.
- WANG, W. C., A. L. MÄKELÄ, V. NÄNTÖ, P. MÄKELÄ & H. LAGSTRÖM, 1998: *The serum selenium concentrations in children and young adults: a long-term study during the Finnish selenium fertilization programme*. European Journal of Clinical Nutrition (London) 52 (7): 529-535.
- WANG, W. C., V. NÄNTÖ, A. L. MÄKELÄ & P. MÄKELÄ, 1995: *Effect of nationwide selenium supplementation in Finland on selenium status in children with juvenile rheumatoid arthritis. A ten-year follow-up study*. Analyst (London) 120 (3): 955-958.
- WATKINSON, J. H., 1983: *Prevention of selenium deficiency in grazing animals by annual topdressing of pasture with sodium selenate*. The New Zealand Veterinary Journal (Wellington) 31 (5): 78-85.
- WOLF, W. R. & R. J. GOLDSCHMIDT, 2007: *Updated estimates of the selenomethionine content of NIST wheat reference materials by GC-IDMS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry (Dunaj) 387 (7): 2449-2452.

UPORABA DVO-FOTONSKEGA KONFOKALNEGA MIKROSKOPA ZA RAZISKOVANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI EKTOMIKORIZNIH GLIV IN ANALIZA SLIK S PROGRAMOM ImageJ

USE OF TWO-CONFOCAL MYCROSCOPY FOR RESEARCH OF ENZYMATIC ACTIVITY OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI AND IMAGE ANALYSIS WITH ImageJ PROGRAM

Ines Štraus^{1*}, Marko Kreft² & Hojka Kraigher¹

Delo je prispelo 27. decembra 2016, sprejeto 31. decembra 2016.

Received December 27, 2016; accepted December 31, 2016.

IZVLEČEK

Uporaba dvo-fotonskega konfokalnega mikroskopa za raziskovanje encimske aktivnosti ektomikoriznih gliv in analiza slik s programom ImageJ

Simbioza med ektomikoriznimi glivami in gozdnimi drevesi prispeva k rasti dreves in delovanju ekosistema. Ektomikorizne glive so razvile visoko diferencirane strukture, ki omogočajo različne načine privzemanja hranilnih snovi in transport le teh do korenin. Aktivnost fosfatov v mikoriznih glivah omogoča dostopnost fosfatnih spojin v tleh, do katerih rastline sicer nimajo dostopa. V raziskavi smo analizirali aktivnost na površino hif vezane fosfataze (SBP) mikoriznih gliv pri sadikah bukve (*Fagus sylvatica* L.) in predstavili metodo za zajemanje in analizo slik fosfatne aktivnosti. Uporabili smo dvofotonski konfokalni laserski mikroskop LSM 7 MP, ki omogoča zajemanje slik od površine mikoriznega plašča skozi mikorizni plašč vse do površine koreninskih celic. Koreninske vršičke smo obarvali s komercialnim barvilom ELF[®] 97. Slike smo analizirali s prosto dostopnim programom ImageJ. V članku smo podrobno opisali postopek analize in predstavili prednosti in slabosti izbrane metode.

Ključne besede: na površino vezana fosfataza, eksplozijski tipi, fosfat, ELF[®] 97, bukev

ABSTRACT

Use of two-confocal microscopy for research of enzymatic activity of ectomycorrhizal fungi and image analysis with ImageJ program

The ectomycorrhizal symbiosis of forest trees contributes to the function of ecosystem and tree growth. The symbiotic organs of ectomycorrhiza (ECM) are highly differentiated structures differing in nutrient uptake, transfer capacities and ability to promote tree growth. In the present study surface-bound phosphatase activity (SBP) was analyzed on ectomycorrhiza of beech seedlings (*Fagus sylvatica* L.). The method for images acquisition and their analysis was discussed. Two-photon confocal laser scanning microscope LSM 7 MP was used to study spatial distribution of SBP enzymatic activity in various thicknesses of ECM mantle in intact (non-sectioned) ECM root tips. ELF[®] 97 was used for staining phosphatase enzymes. Images were analyzed using the freely available program ImageJ. In this article, we describe in detail the analysis procedure and the advantages and disadvantages of the method.

Key words: surface-bound phosphatase, exploration types, phosphate, ELF[®] 97, beech

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, & Inštitut za patofiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia; Celica Biomedical, Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana, Slovenia

* ines.straus@gozdis.si

1 UVOD

Encimska aktivnost ektomikoriznih gliv (ECM) in njihovega zunaj koreninskega micelija ima pomembno vlogo pri prenosu hranil iz gozdnih tal in listnega opada do rastline. Encimi, ki jih glive sproščajo v okolico, omogočajo razgradnjo snovi, ki so vezane v tleh in rastlinam nedostopne (KJØLLER & STRUWE 2002). V gozdnih ekosistemih imajo glive ključno vlogo pri obratu, preperevanju in mineralizaciji ogljika, dušika, fosforja in drugih snovi, ki jih pretvorijo v obliko, ki je zopet dostopna rastlinam in drugi talni mikroflori (EKBLAD s sod. 2013, WALLANDER s sod. 2013).

Za opazovanje encimske aktivnosti lahko izbiramo med nedestruktivnimi in destruktivnimi metodami. Nedestruktivne metode temeljijo na opazovanju encimske aktivnosti pri živih celicah. Navadno te metode ne vključujejo barvanja, za opazovanje pa izberemo svetlobni mikroskop (arbuskularna mikoriza), epifluorescenčni mikroskop (avtofluorescenca) (VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005) ali konfokalni laserski mikroskop (SCHWEIGER s sod. 2002). Destruktivne metode zajemajo dva tipa barvanj: vitalna barvanja, kjer opazovanje aktivnosti encimov temelji na metabolno aktivnem miceliju gliv in ne vitalna barvanja, kjer tehnike barvanja obarvajo tako vitalen kot odmrli mikorizni micelij (VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). Nedestruktivne metode so nava-

dno bolj v uporabi pri arbuskularni mikorizi, kjer so korenine neobarvane in ni potrebno predhodno razbarvanje, medtem ko je primarna skorja in plašč ektomikoriznih korenin naravno obarvan, kar zahteva predhodno razbarvanje korenin (VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). PRITSCH s sodelavci (2004) so razvili avtomatizirano metodo z mikrotitrskimi ploščami, ki omogoča merjenje encimske aktivnosti fosfataze, hitinaze in β -glukozidaze s spektrofotometrom (oz. čitalcem mikrotitrskih plošč).

V članku bomo predstavili uporabo dvofotonskega konfokalnega laserskega mikroskopa LSM 7 MP, ki omogoča opazovanje debelih preparatov ektomikoriznih korenin, brez predhodne priprave rezin in analizo slik s programom ImageJ ter prednosti oziroma slabosti omenjene metode. Opazovali smo aktivnost na površino vezane fosfomonoesteraze (*angl. surface bound phosphatase – SBP*) pri različnih morfotipih ektomikoriznih gliv. Fosfomonoesteraze so encimi, ki razgrajujejo različne substrate v tleh, kot so inozitol fosfat, polifosfati, mononukleotidi in fosforilirani sladkorji. Glede na optimum pH fosfomonoesteraz ločimo kisle in alkalne fosfataze (CRIQUET s sod. 2004). Aktivnost kisle fosfataze, ki smo jo preučevali, temelji na hidrolizi p-nitrofenil fosfata (pNPP) v p-nitrofenol fosfat (pNP) in fosfat (P) (ALVAREZ s sod. 2004).

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Vzorčenje in priprava vzorca za mikroskopiranje

Za mikroskopiranje smo pripravili sveže vzorce mikoriznih kratkih korenin. Vzorčili smo iz rizotronov (Slika 1), lončnih poskusov ali iz narave. Mikorizne kratke korenine smo odrezali s škarjami in jih prenesli v petrijevke z vodo. S korenin smo s pomočjo čopiča odstranili substrat in jih pripravili za barvanje. Za vsak vzorec smo pripravili po tri mikorizne kratke korenine dolžine 3 do 4 mm.

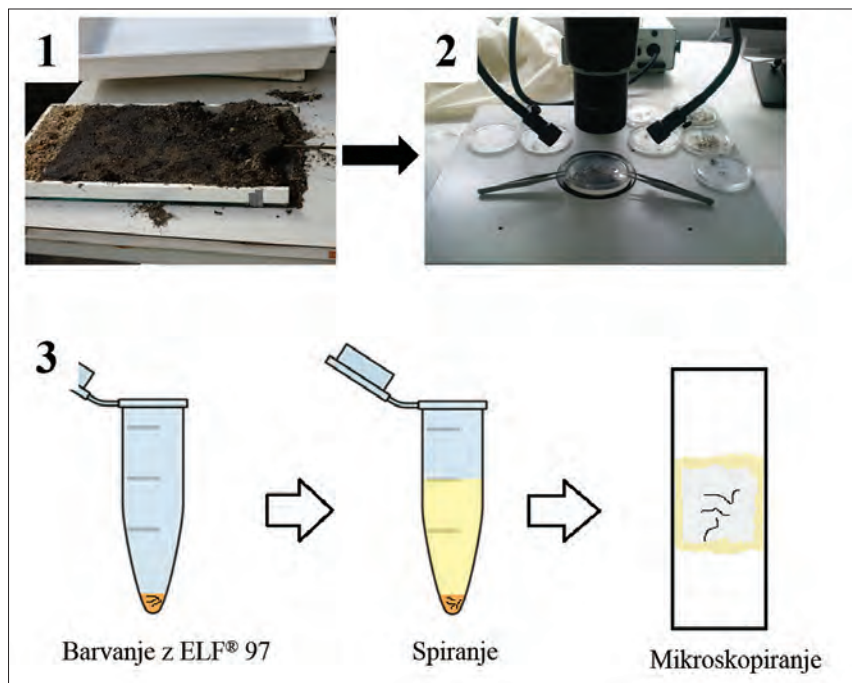
Protokol za pripravo mikoriznih preparatov smo prilagodili po ALVAREZ s sodelavci (2004). Za pripravo preparata smo uporabili fosfatazni substrat ELF® 97 (Molecular Probes, Inc., USA) za barvanje in citrat fosfatni pufer za spiranje korenin po barvanju. Citrat fosfatni pufer smo pripravili z mešanjem 3,025 g/l Tris-(hidroksimetil)-aminometana, 2,9 g/l maleinske kisline, 3,5 g/l citronske kisline, 1,57 g/l borove kisline in 1 M NaOH. Pufer smo s pomočjo 1 M HCl umerili na

pH 5. Raztopino ELF® 97 smo redčili s citrat fosfatnim pufrom v razmerju 10:2 v/v (pufer/ELF® 97)

2.2 Barvanje mikoriznih korenin z raztopino ELF® 97

Za vsak tip ektomikorize smo barvali po tri kratke korenine (Slika 1). Za analize encimske aktivnosti fosfataze pri glivah (ALVAREZ s sod. 2004) je v uporabi komercialni kit ELF® 97 (JOHNSON & SPENCE 2010). Kit vsebuje topni substrat, ki ob prisotnosti delovanja fosfataze fluorescira. Prednost ELF® 97 je ta, da je razlika med vrhovoma ekscitacijske in emisijske valovne dolžine približno 200 nm, kar omogoča, da lahko signal, ki nastane kot posledica delovanja encimov, jasno ločimo od signala, ki nastane kot posledica avtofluorescence mikoriznega micelija (JOHNSON & SPENCE 2010).

Očiščene mikorizne korenine smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in dodali 44 μ l raztopine ELF®



Slika 1: 1-vzorčenje ECM korenin iz rizotrona; 2-priprava ECM korenin za barvanje; 3-barvanje ECM korenin z ELF® 97 za 15 minut, spiranje s citrat fosfatnim pufrom, da zaustavimo encimatsko reakcijo in prenos obarvanih koreninskih vršičkov na objektno stekelce, kjer smo jih pokrili s krovnim stekelcem in zalepili z voskom

Figure 1: 1-ECM roots tips were sampled from rhizotron; 2- ECM roots tips were prepared for staining; 3-ECM root tips were stained using ELF® 97 staining, after 15 minutes incubation they were rinsed with citrate-phosphate buffer solution in order to stop the enzymatic reaction and transferred to object slides and sealed with cover slides and wax

97 (pH=5), 5x redčitev. Korenine smo barvali 15 minut, nato smo jih previdno prenesli v nove 1,5 µl mikrocen-trifugirke, ter jih spirali s 100 µl citrat fosfatnega pufra (pH=5). Obarvane mikorizne korenine smo po spira-nju prenesli na objektna stekelca s pufrom, na katera smo v obliki kroga nakapljali stopljen vosek v debelini mikoriznih korenin. Na korenine smo položili krovna stekelca in jih dodatno zalepili s stopljenim voskom vzdolž robov.

2.3 Mikroskopiranje

Mikroskopiranje smo izvajali na Inštitutu za patofizi-ologijo v Ljubljani, v Laboratoriju za neuroendokrino-logijo in molekularno celično fiziologijo (referenčni center za konfokalno mikroskopijo Carl Zeiss). Za mi-kroskopiranje smo uporabili dvofotonski konfokalni mikroskop LSM 7 MP (Zeiss, Nemčija), ki je bil name-ščen v zatemnjenem prostoru na protivibracijski mizi, saj lahko mehanski tresljaji in svetloba motijo meritve. Slike za analize (serija optičnih rezin po z-osi; ang.: Z-

-stack) smo zajemali s programsko opremo ZEN 2012 (black edition, Release version 8.0, © Carl Zeiss Micro-scropy GmbH 1997-2013). Razmik med rezinami je bil 10 µm. Za vsak vzorec smo opravili tri ponovitve me-ritev na treh različnih lokacijah na korenini.

2.4 Dvofotonski konfokalni laserski mikroskop

Za razliko od elektronske mikroskopije (STEMPAK & WARD 1964), ki je sicer tudi zelo razširjena metoda, omogoča fluorescenčna mikroskopija opazovanje živih celic in procesov, ki potekajo v njih (HEINTZ-MANN & FICZ 2006, LIPPINCOTT-SCHWARTZ & PAT-TERSON 2003). Fluorescenca je pojav, pri katerem lahko s svetlobo primerne valovne dolžine molekulo vzbudi-mo v višje energetske stanje, nato pa vzbujena molekula izseva foton in preide nazaj v osnovno energetske stanje (HELL & WICHMANN 1994). Osnova konfokal-nega mikroskopa je fluorescenčni mikroskop (HEIN-TZMANN & FICZ 2006). Konfokalni mikroskop ne osvetljuje celotnega vzorca hkrati, temveč ga z laser-

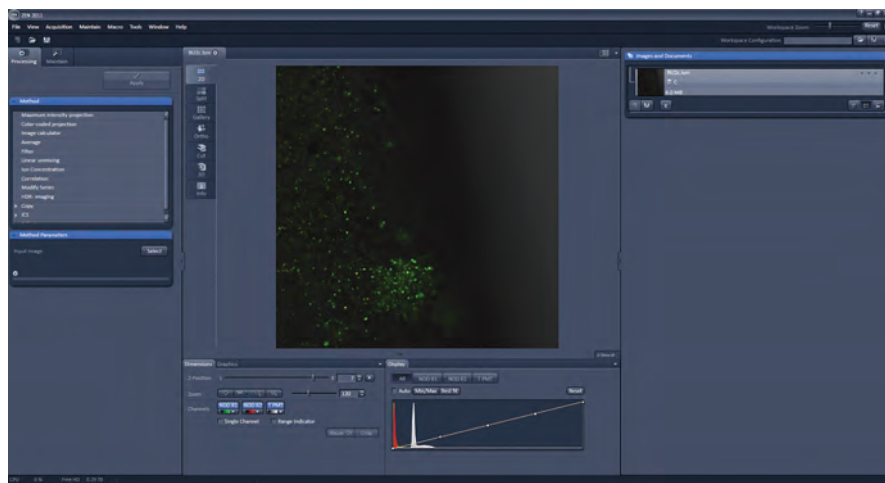
skim žarkom pregledujemo v določeni optični ravnini (HEINTZMANN & FICZ 2006). Vzbuje fluorescentno svetlobo iz točk sprejme detektor, ki informacijo s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Običajni enofotonski konfokalni mikroskop ima vgrajeno zaslonko, ki preprečuje pot svetlobe iz ozadja vzorca do detektorja (FÖLDES-PAPP, DEMEL & TILZ 2003, WILHELM s sod. 2014). Dvofotonski konfokalni mikroskop vzbuja molekule z dvema fotonoma daljše valovne dolžine (DENK s sod. 1990). Molekula mora sočasno absorbirati dva fotona, da preide v višje energetske stanje, kar zagotovimo z veliko gostoto fotonov, oziroma z zelo veliko intenziteto svetlobe (DENK s sod. 1990, HELMCHEN & DENK 2005), kar dosežemo z zbiranjem žarkov v gori-

šču in s pulznim delovanjem laserja. Posledično je intenziteta svetlobe dovolj velika, da pride do vzbujaanja fotonov le v gorišču, hkrati pa se izognemo moteči svetlobi iz ozadja vzorca (DENK s sod. 1994). Ker pri dvofotonskem mikroskopu vzbujamo fotone z dvakrat daljšo valovno dolžino, je v primerjavi z navadnim konfokalnim mikroskopom tudi ločljivost slike posledično nekoliko manjša, medtem ko je sipanje fotonov manjše. Zato izbiro mikroskopa prilagodimo vzorcu: če je vzorec debel in se svetloba fotonov močno siplje, izberemo dvofotonski konfokalni mikroskop, v nasprotnem primeru pa enofotonski konfokalni mikroskop (DENK s sod. 1994). Za naše raziskave smo uporabili dvofotonski laserski mikroskop.

3 ANALIZA SLIK S PROGRAMOM ImageJ 1.46R

Slike smo analizirali s programom ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, USA). Za analizo smo slike najprej izvozili iz programa ZEN 2011 (Slika 2) in jih

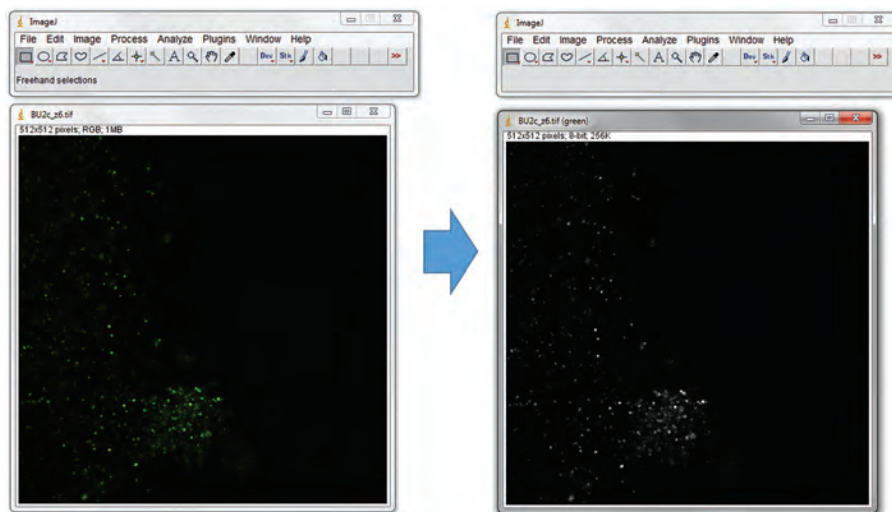
shranili v formatu .tif. Pri slikah smo pred izvažanjem izklopili kanal z belo svetlobo, ker je sicer le-ta motil nadaljnje analize.



Slika 2: Izvoz slike iz programa ZEN 2011 v formatu .tif za nadaljnje analize
Figure 2: Image export from ZEN 2011 in .tif format for further analysis

Nato smo sliko odprli v programu ImageJ 1.46r, jo razdelili na kanale (*Split channels*) in zaprli vse razen

zelenega kanala (Slika 3). Iz originalne slike smo naredili dvojnike, na katerih smo nadaljevali z analizami.

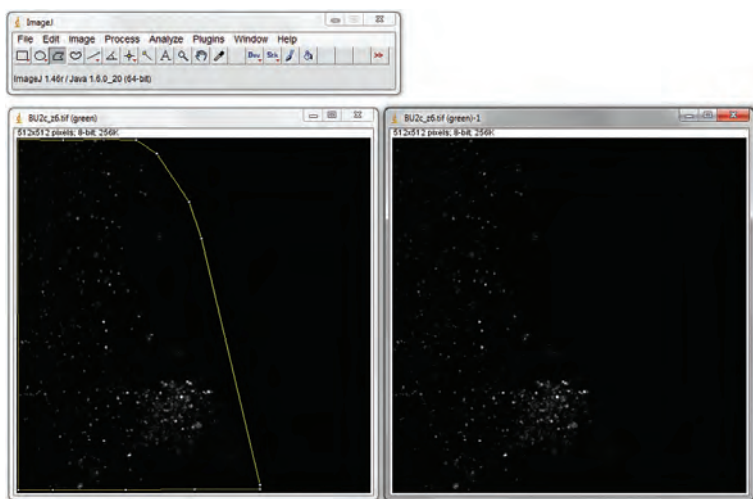


Slika 3: Slika originala preden smo jo razdelili na kanale (levo) in slika z izbranim zelenim kanalom pripravljena za nadaljnje analize (desno)

Figure 3: Original image before separating on channels (left) and selected green channel image of the same picture ready for analyses (right)

3.1 Analiza originala:

S funkcijo *Polygon Selections* smo označili celotno površino mikorizne korenine oziroma hife, ki smo jo želeli analizirati (Slika 4).

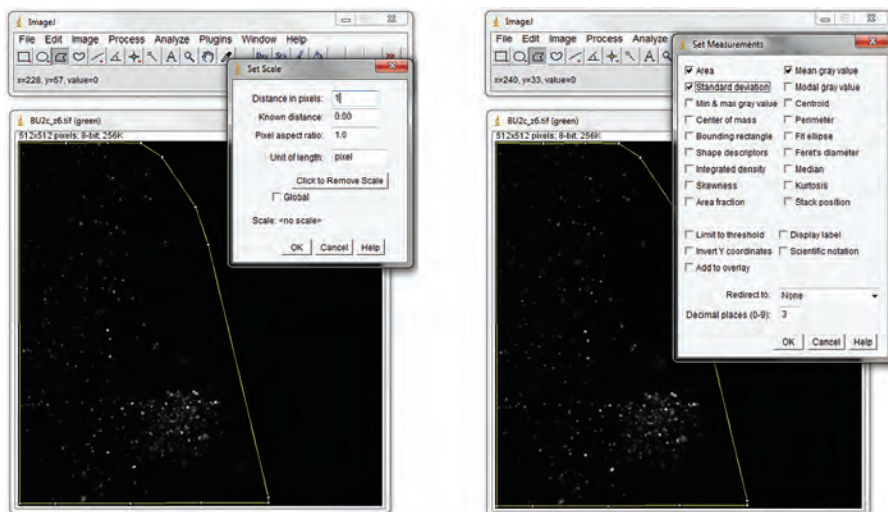


Slika 4: Označevanje površine, kjer se pojavljajo aktivni encimi SBP na mikoriznem plašču z orodjem *Polygon selections*

Figure 4: Marking areas where active enzymes SBP were present on mycorrhizal mantle surface using tool *Polygon Selections*

Nato smo nadaljevali z nastavitvami: *Analyze* → *Set Scale...*, kjer smo pri prvi postavki *Distance in Pixels* vpisali 1 in tako določili velikost točkovne enote. Pri nastavitvah (*Set Measurements*) smo za izbrana parametra izbrali površino označene površine (*Area*) in

povprečno intenziteto fluorescence v konkretni sliki v plašču (*Mean gray value*). Podatek *Mean gray value* ima smisel le v sivi sliki preden določimo prag. Pri analizi originala odključamo opcijo omejitev na prag (*Limit to Threshold*) (Slika 5).

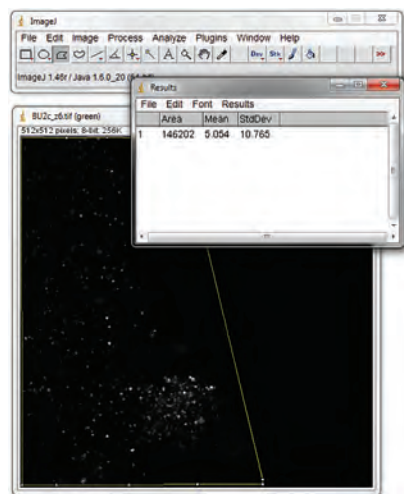


Slika 5: Določevanje velikosti točkovne enote (piksel) (levo) in izbor zelenih parametrov za analize, v našem primeru površina označene površine (*Area*) in povprečna intenziteta fluorescence v konkretni sliki v plašču (*Mean gray value*) (desno). Pri nastavitvah za analize originala odključamo funkcijo omejitve na nadprazno vrednost.

Figure 5: Determination of the size of the pixel unit (left) and selection of the parameters for the analysis in this case the area of the selected surface (*Area*) and the average intensity of fluorescence (*Mean gray value*) (right). In window *Set Measurements* for analyses of the original image tick off option *Limit to threshold*.

Ko smo nastavili parametre, smo nadaljevali z meritvami: *Analyze* → *Measure*. Pojavilo se je okno z meritvami (Slika 6), ki smo jih prepisali v tabelo v MS

Excel, ki smo jo pripravili sami. Prepisali smo podatke za površino (*Area*) in povprečno intenziteto fluorescence v konkretni sliki v plašču (*Mean gray value*).



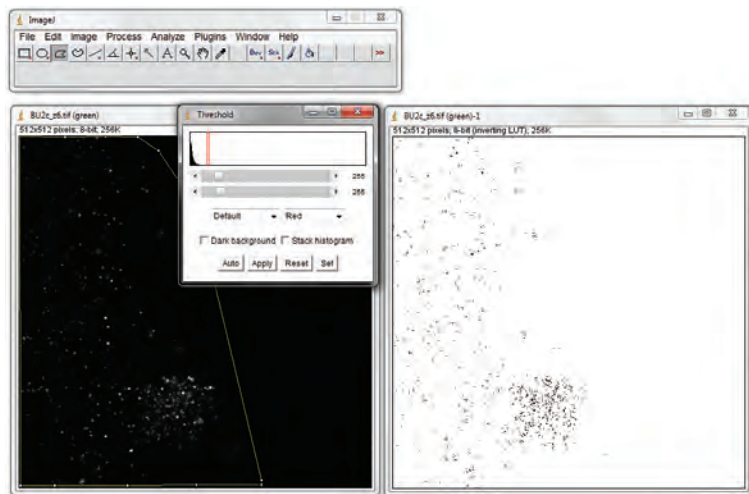
Slika 6: Okno z meritvami, ki jih prepišemo v tabelo MS Excel za nadaljnje analize.
Figure 6: Window with results of measurements, that should be copied in MS Excel table for further analyses.

Po analizi originala smo nadaljevali z analizo na dvojnikih, kjer smo merili vrednosti pri pragu 10 %.

3.2 Analiza dvojnika

Preden smo začeli z analizo, smo postavili prag: *Image* → *Adjust* → *Threshold...* (Slika 7). V odprtem

oknu se pojavi graf in dva drsnika. Za analize premikamo le zgornji drsni, ki na nastavimo na želeno nadprazno vrednost vseh dimenzij, pri čemer upoštevamo da je slika 8-bitna. Za prag 10 % nastavimo drsni na 25. Nastavitev potrdimo s klikom na gumb *Apply*.



Slika 7: Nastavitev zelene nadprazne vrednosti za analize.
Figure 7: Setting of threshold value for analyses.

Nato smo kopirali označeno površino iz originalne slike na dvojnik: *CTRL+C* → *Edit* → *Selection* → *Restore Selection*

Sledile so nastavitve za analize: *Analyze* → *Set*

Scale... → *Distance in Pixels = 1*, *Set Measurements...*, kjer smo odključali *Limit to Threshold*

Pri opravljenih meritvah smo prepisali le vrednost za površino (*Area*): *Analyze* → *Measure...*

4 RAZPRAVA

Encimsko aktivnost lahko ugotavljamo s pomočjo barvil, ki temeljijo na fluorescenci. Za ta namen so v uporabi komercialno dostopni kiti (JOHNSON & SPENCE 2010). Za analize encimske aktivnosti fosfataze pri glivah (ALVAREZ s sod. 2004, 2012) je v uporabi komercialni kit ELF® 97 (JOHNSON & SPENCE 2010). Kit vsebuje topni substrat, ki ob prisotnosti delovanja fosfataze proizvede fotostabilen rumeno-zelen precipitat na strani aktivnega encima. Prednost ELF® 97 je ta, da je razlika med vrhovoma ekscitacijske in emisijske valovne dolžine približno 180 nm, kar omogoča, da lahko signal, ki nastane kot posledica delovanja encimov, jasno ločimo od signala, ki nastane kot posledica avtofluorescence mikoriznega micelija (JOHNSON & SPENCE

2010). Substrat se lahko uporablja za opazovanje živih celic, vendar nima možnosti prehajanja skozi celično steno, zato lahko opazujemo le aktivnost na površino vezanih encimov. Avtorji (JOHNSON & SPENCE 2010) protokolov navajajo, da intenziteta fluorescentnega signala fiksniranih preparatov ostaja bolj ali manj enaka več mesecev ali celo let, kar potrjujejo tudi naše izkušnje. VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT (2005) uvrščajo ELF® 97 med vitalna barvila, saj ni potrebno predhodno razbarvanje korenin. V naših raziskavah smo opazili, da barvilo prosto prehaja do mikoriznega plašča, kjer koreninski vršiček ni obdan z gostimi izhajajočimi elementi, kot so hife, oziroma kadar je korenina svetlih barv. V primeru, ko je preplet hif okrog ko-

reninskega vršička gost, smo opazili, da je preparat slabše obarvan ali je obarvan le na površini in barvilo ni prodrlo v notranjost. Za temno obarvane koreninske vršičke pa ne moremo zagotovo trditi, ali je nizek delež opaženih encimov posledica slabšega prodiranja barvila v notranjost, ali je to posledica temno obarvanega preparata, ki onemogoča prehod emisijske svetlobe. Pri uporabi ELF® 97 moramo biti pozorni na biotske (število bakterij in gliv, koncentracija proteinov) in abiotske dejavnike (pH, temperatura, vlaga), ki lahko vplivajo na aktivnost encima in s tem na rezultate. Vpliv pH na aktivnost fosfataze je vrstno specifičen (ALVAREZ s sod. 2004; BAGHEL, SHARMA & PANDEY 2009). BAGHEL, SHARMA & PANDEY (2009) so pri glivi *Cantharellus tropicalis* dokazali višjo aktivnost SBP pri 40 °C in značilno nižjo aktivnost pri 35 °C. Korelacijo med kisló fosfatazo in temperaturo ter vlago so opazili tudi CRIQUET s sodelavci (2004) v listnem opadu. ALVAREZ s sodelavci (2012) so preučevali vpliv morfotipov (*Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum*, *Descolea antarctica*) in vnos hranilnih snovi (angl. *soil fertility*) v tla na aktivnost kislé fosfataze. Ugotovili so, da na prostorsko razporeditev kislé fosfataze v mikoriznem miceliju vpliva morfotip (zunaj koreninski micelij, mikorizni plašč in Hartigova mreža), medtem ko vnos snovi v tla vpliva na encimsko aktivnost zunaj koreninskega micelija in Hartigove mreže.

Dvofotonski konfokalni mikroskop omogoča opazovanje vitalnih preparatov, poleg tega pa z njim lahko opazujemo debelejšé preparate oziroma kar cele koreninske vršičke, saj lahko optično prodremo skozi mikorizni plašč vse do celic korenine in zato predhodna priprava rezin ni potrebna. Tako prihranimo na času, poleg tega pa opazujemo nepoškodovan koreninski vršiček v celoti, razen v že prej omenjenem primeru temno obarvanih mikoriznih gliv, kjer bi morali kore-

nine predhodno očistiti oziroma razbarvati (SCHWEIGER s sod. 2002, VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). Za encimske analize so v uporabi tudi encimski testi na filter ploščah (PRITSCH s sod. 2011), ki omogočajo analize različnih encimov hkrati, vendar imamo v tem primeru le podatek o jakosti fluorescenčnega signala, nimamo pa podatka o razporejanju encimov v mikoriznem miceliju.

Za analize slik smo izbrali prosto dostopen program ImageJ 1.46j, ki je v znanosti uporabljen že več kot 25 let, še posebej se je razširil med uporabniki za analize slik s področja biologije (SCHNEIDER, RASBAND & ELICEIRI 2012). ImageJ 1.46r v našem primeru na sliki originala izmeri površino, ki jo zasede vzorec. Rezultati analize predstavljajo povprečne intenzitete fluorescence teh površin za vsak vzorec. Pri tem je potrebno opozoriti, da ima analiza intenzitete fluorescence na originalni sliki smisel le, kadar so vsi pogoji med vzporedno posnetimi slikami enaki (enako barvanje, enaka moč laserja, fotopomnoževalke in drugo). Zagotavljanje enakih pogojev je skoraj nemogoče, zato smo za analize izbrali kontrastne slike, kar pomeni merjenje površine pri določenem pragu. To nam omogoča tudi ponovljivost metode in primerjanje podatkov. Preden se odločimo, kateri prag bomo izbrali, naredimo vzporedne analize slik pri različnih nadpraznih vrednostih in izberemo tisto nadprazno vrednost, ki najbolj ustrezno odstrani vsa nespecifična barvanja. Pri delu s programom ImageJ 1.46r smo opazili, da je enostaven za uporabo, da preprosto označimo površino, ki jo želimo analizirati in da so meritve zelo natančne. Slabosti metode, ki smo jih med uporabo opazili, so, da (1) je v primeru, ko je odprtih več oken (original in dvojnik), potrebno vedno znova označiti na katero okno se nanaša ukaz oziroma meritev, (2) funkcija razveljavi (*Undo*) sicer deluje, ampak naslednja meritev ni več zanesljivo pravilna.

5 ZAKLJUČKI

Metoda, ki smo jo predstavili, je nova in edinstvena predvsem zaradi uporabe dvofotonskega laserskega mikroskopa. Omogoča opazovanje encimske aktivnosti fosfataze in njeno razporejanje v mikoriznem miceliju brez uporabe rezin. Konfokalna mikroskopija je že bila uporabljena za opazovanje aktivnosti SBP pri

ECM glivah (ALVAREZ s sod. 2004, 2012), vendar vedno na pripravljenih rezinah ECM korenin, ki omogoča ozek vpogled v zelo majhen del korenine. V prihodnje želimo metodo še razviti in raziskati, ali je razporejanje encimov pri različnih eksploracijskih tipih povezano z njihovo funkcijo v naravi.

6 SUMMARY

Enzymatic activity could be detected by dyes based on fluorescence. For this purpose, the commercially available kits are applicable (JOHNSON & SPENCE 2010). ALVAREZ et al. (2004, 2012) used commercial kit ELF® 97 for analyses of surface-bound phosphatase activity. ELF® 97 contains a soluble ELF substrate, which forms an intense yellow-green-fluorescent alcohol precipitate at the site of phosphatase activity. ELF® 97 alcohol precipitate is separated from its excitation maximum by over 180 nm, so ELF 97 signal can be clearly distinguished from most cell and mycorrhizal mycelium autofluorescence (JOHNSON & SPENCE 2010). Substrate can be used for observing life cells, but it can not pass the cell wall, so just surface bound enzymatic activity can be analyzed. The authors of protocols indicate, that ELF 97 phosphate-based staining of fixed samples can persist for a month to one year with little if any loss of signal, and this was noticed also in our experiments. VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT (2005) classified ELF 97 into vital staining techniques, because clearing of roots is not necessary. In our research, we noticed that the dye passes freely to the mycorrhizal sheath, if the root tips are not surrounded by dense emanating elements such as hyphae, or if the roots are of light colors. In the cases in which hyphae around the root tips are dense, we observed that the mycorrhizal structures are less colored or are colored only on the surface, indicating the dye has not penetrated in the interior. For dark colored root tips we cannot definitely claim whether a low percentage of the observed enzyme results from lower dye penetration into the interior or whether this is due to the dark-colored mycorrhizal mantle that prevents the emission light passing through. When using ELF® 97 care must be taken on biotic (the number of bacteria and fungi, protein concentration) and abiotic factors (pH, temperature, humidity), which can affect the enzyme activity and thus also the results. The influence of pH on the phosphatase activity is species dependent (ALVAREZ et al. 2004, BAGHEL, SHARMA & PANDEY 2009). BAGHEL, SHARMA & PANDEY (2009), demonstrated higher activity of SBP at 40 °C and typically a lower activity at 35 °C for the fungus *Cantharellus tropicalis*. The correlation between the acid phosphatase, and the temperature and humidity were also observed by CRIQUET et al. (2004) in the leaf litter. ALVAREZ et al. (2012) studied the influence of morphotypes (*Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum geophilum*, *Descolea Antartica*) and soil fertility on acid phosphatase activity. They found

that spatial distribution of acid phosphatase in mycorrhizal mycelium is affected by mycorrhizal morphotype (extraradical mycelium, mycorrhizal mantle and Hartig net), while soil fertility had a significant effect on the enzymatic activity in the extraradical mycelium and Hartig net.

Two-photon confocal microscope allows observation of vital mycorrhizal fungi, in addition prepared samples can be thick, or even whole root tips can be observed, because the laser beam can penetrate through mycorrhizal mycelium layers to the root cells, therefore, the prior preparation of the mycelium slices is not necessary. The advantage of this microscope is in its time-efficiency and the possibility to observe intact root tips, except for the before mentioned case of dark colored mycorrhizal fungi, which should be cleared before staining (SCHWEIGER et al. 2002, VIERHEILIG, SCHWEIGER & BRUNDRETT 2005). For analysis of enzymatic activity enzyme assays on the filter plates are also in use (PRITSCH et al. 2011), which enable the analysis of several enzymes at the same time, however, this tests give only information of the intensity of the fluorescent signal, but no information about the allocation of enzymes in mycorrhizal mycelium.

For image analysis we have selected the freely available program ImageJ 1.46j, which is used in science for more than 25 years, particularly for image analysis in biology (SCHNEIDER, RASBAND & ELICEIRI 2012). In our case, ImageJ measures the area covered by the sample in the original image. Results of analyzes represent the average intensity of the measured areas for each sample. It is important to notice, that analyzes of intensity on original images are suitable if all conditions between compared images are the same (the same staining, the same power of laser, photomultiplier...). More reproducible and also simpler is to analyze the copies representing contrasted images, measuring the area above the threshold value. It is important to choose the threshold that most effectively cuts off all non-specific staining. When working with the program ImageJ 1.46r we noticed that it is a simple and intuitive program to use, that has high accuracy of selection and it is simple to select the measuring area. Disadvantages of ImageJ were (1) a click on every image, and for each step, is needed if more images are open (original and duplicates), (2) caution in the work order is necessary, since if the operator uses the *Undo* function it can result in wrong measurements.

7 CONCLUSIONS

The method used in our study is novel because of use of two-photon confocal microscopy. It allows to study spatial distribution of SBP enzymatic activity in various thicknesses of ECM mantle in intact (non-sectioned) ECM root tips. Although confocal microscopy for observation of SBP activity in ECM was already used be-

fore (ALVAREZ et al. 2004, 2012), it was used only in sectioned ECM roots, that allowed an insight into a very small fraction of the ECM root. We suggest that two-photon confocal microscopy could prove useful in future to study distribution of enzymatic activity of different exploration types and their function in nature.

ZAHVALA - ACKNOWLEDGEMENTS

Predstavljena metoda je bila razvita v okviru doktorske naloge mlade raziskovalke (IŠ), in je bila financirana iz ARRS v okviru programske skupine P4-0107, Ministrstva za Kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano v okviru projektov L4-2265 in L4-4318 in projektu EU-

FORINNO (RegPot No. 315982). Zahvaljujemo se tudi podjetju Celica d.o.o. in Inštitutu za patofiziologijo Medicinske univerze v Ljubljani, ki sta omogočila delo na dvo-fotonskem konfokalnem mikroskopu.

8 LITERATURA – REFERENCES

- ALVAREZ, M., R. GODOY, W. HEYSER & S. HÄRTEL, 2004: *Surface-bound phosphatase activity in living hyphae of ectomycorrhizal fungi of Nothofagus obliqua*. Mycologia (Lawrence) 96 (3): 479-487.
- ALVAREZ, M., D. HUYGENS, L. M. DÍAZ, C. A. VILLANUEVA, W. HEYSER & P. BOECKX, 2012: *The spatial distribution of acid phosphatase activity in ectomycorrhizal tissues depends on soil fertility and morphotype, and relates to host plant phosphorus uptake*. Plant, Cell & Environment (New Jersey) 35 (1): 126-135.
- BAGHEL, R. K., R. SHARMA & A. K. PANDEY, 2009: *Activity of acid phosphatase in the ectomycorrhizal fungus Cantharellus tropicalis under controlled conditions*. Journal of Tropical Forest Science (Ithaka) 21 (3): 218-222.
- CRICQUET, S., E. FERRE, A. M. FARNET & J. LE PETIT, 2004: Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. Soil Biology and Biochemistry (Amsterdam) 36 (7): 1111-1118.
- DENK W., STRICKLER, J. H., WEBB, W. W. 1990. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science (New York), 248, 4951: 73-76.
- DENK, W., K. R. DELANEY, A. GELPERIN, D. KLEINFELD, B. W. STROWBRIDGE, D.W. TANK & R. YUSTE, 1994: *Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy*. Journal of Neuroscience Methods (Amsterdam) 54 (2): 151-162.
- EKBLAD, A., H. WALLANDER, D. L. GODBOLD, C. CRUZ, D. JOHNSON, P. BALDRIJAN, R. G. BJÖRK, D. EPRON, B. KIELISZEWSKA-ROKICKA, R. KJØLLER, H. KRAIGHER, E. MATZNER, J. NEUMANN & C. PLASSARD, 2013: *The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling*. Plant and Soil (Dordrecht) 366 (1-2): 1-27.
- FÖLDES-PAPP, Z., U. DEMEL & G. P. TILZ, 2003: *Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview*. International Immunopharmacology (Amsterdam) 3 (13-14): 1715-1729.
- HEINTZMANN, R. & G. FICZ, 2006: *Breaking the resolution limit in light microscopy*. Briefings in Functional Genomics & Proteomics (Oxford) 5 (4): 289-301.
- HELL, S. W. & J. WICHMANN, 1994: *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Optics Letters (Washington) 19 (11): 780-782.
- HELMCHEN, F. & W. DENK, 2005: *Deep tissue two-photon microscopy*. Nature Methods (New York) 2 (12): 932-940.
- JOHNSON, J. & M. T. Z. SPENCE, 2010: *Phosphatase-Based Signal Amplification Techniques. V: The Molecular Probes® Handbook. A guide to fluorescence probes and labeling technologies*. 11th edition. Life Technologies Corporation (Waltham): pp. 203-211.
- KJØLLER, A. H. & S. STRUWE, 2002: *Fungal communities, succession, enzymes and decomposition*. V: Bruns, R. G. & R. P. Dick R.P., (ur.): *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. CRC Press (New York), pp. 267-285.

- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & G. H. PATTERSON, 2003: *Development and use of fluorescent protein markers in living cells*. Science (Washington) 300 (5616): 87-91.
- PRITSCH, K., S. RAIDL, E. MARKSTEINER, H. BLASCKE, R. AGERER, M. SCHLOTER & A. HARTMANN, 2004: *A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferyl-labelled fluorogenic substrates in a microplate system*. Journal of Microbiological Methods (Amsterdam) 58 (2): 233-241.
- PRITSCH, K., P. COURTY, J.-L. CHURIN, B. CLOUTIER-HURTEAU, M. ALI, C. DAMON, M. DUCHEMIN, S. EGLI, J. ERNST, T. FRAISSINET-TACHET, F. KUCHAR, E. LEGNAME, R. MARMEISSE, A. MÜLLER, P. NIKOLOVA, M. PETER, C. PLASSARD, F. RICHARD, M. SCHLOTER, M.-A. SELOSSE, A. FRANC & J. GARBAYE, 2011: *Optimized assay and storage conditions for enzyme activity profiling of ectomycorrhizae*. Mycorrhiza (Berlin) 21 (7): 589-600.
- SCHNEIDER, C. A., W. S. RASBAND & K. W. ELICEIRI, 2012: *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods (New York) 9: 671-675.
- SCHWEIGER, P. F., H. ROUHIER & B. SÖDERSTRÖM, 2002: *Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy*. Mycological Research (Manchester) 106 (3): 349-354.
- STEMPAK, J. G. & R. T. WARD, 1964: *An improved staining for electron microscopy*. The Journal of Cell Biology (New York) 22 (3): 697-701.
- VIERHEILIG, H., P. SCHWEIGER & M. BRUNDRETT, 2005: *An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots*. Physiologia Plantarum (Chichester) 125 (4): 393-404.
- WALLANDER, H., A. EKBLAD, D. L. GODBOLD, D. JOHNSON, A. BAHR, P. BALDRIAN, R. G. BJÖRK, B. KIELISZEWSKA-ROKICKA, R. KJØLLER, H. KRAIGHER, C. PLASSARD & M. RUDAWSKA, 2013: *Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils – A review*. Soil Biology and Biochemistry (Amsterdam) 57: 1034-1047.
- WILHELM, S., B. GROBLER, M. GLUCH & H. HEINZ, 2014: *Confocal laser scanning microscopy principles*. Microscopy from Carl Zeiss. Zeiss. (Jena): 1-30.

NAVODILA AVTORJEM

Folia biologica et geologica so znanstvena revija IV. razreda SAZU za naravoslovne vede. Objavljajo naravoslovne znanstvene razprave in pregledne članke, ki se nanašajo predvsem na raziskave v našem etničnem območju Slovenije, pa tudi raziskave na območju Evrope in širše, ki so pomembne, potrebne ali primerljive za naša preučevanja.

1. ZNANSTVENA RAZPRAVA

Znanstvena razprava zajema celovit opis izvirne raziskave, ki vključuje teoretični pregled tematike, podrobno predstavlja rezultate z razpravo in zaključki ali sklepi in pregled citiranih avtorjev. V izjemnih primerih so namesto literaturnega pregleda dovoljeni viri, če to zahteva vsebina razprave.

Razprava naj ima klasično razčlenitev (uvod, material in metode, rezultati, diskusija z zaključki, zahvale, literatura idr.).

Dolžina razprave, vključno s tabelami, grafikoni, tablami, slikami ipd., praviloma ne sme presegati 2 avtorskih pol oziroma 30 strani tipkopisa. Zaželeno so razprave v obsegu ene avtorske pole oziroma do dvajset strani tipkopisa.

Razpravo ocenjujeta recenzenta, od katerih je eden praviloma član SAZU, drugi pa ustrezní tuji strokovnjak. Recenzente na predlog uredniškega odbora revije *Folia biologica et geologica* potrdi IV. razred SAZU.

Razprava gre v tisk, ko jo na predlog uredniškega odbora na seji sprejmeta IV. razred in predsedstvo SAZU.

2. PREGLEDNI ČLANEK

Pregledni članek objavljamo po posvetu uredniškega odbora z avtorjem. Na predlog uredniškega odbora ga sprejmeta IV. razred in predsedstvo SAZU. Članek naj praviloma obsega največ 3 avtorske pole (tj. do 50 tipkanih strani).

3. NOVOSTI

Revija objavlja krajše znanstveno zanimive in aktualne prispevke do 7000 znakov.

4. IZVIRNOST PRISPEVKA

Razprava oziroma članek, objavljen v reviji *Folia biologica et geologica*, ne sme biti predhodno objavljen v drugih revijah ali knjigah.

5. JEZIK

Razprava ali članek sta lahko pisana v slovenščini ali katerem od svetovnih jezikov. V slovenščini zlasti tedaj, če je tematika lokalnega značaja.

Prevod iz svetovnih jezikov in jezikovno lektoriranje oskrbi avtor prispevka, če ni v uredniškem odboru dogovorjeno drugače.

6. POVZETEK

Za razprave ali članke, pisane v slovenščini, mora biti povzetek v angleščini, za razprave ali članke v tujem jeziku ustrezen slovenski povzetek. Povzetek mora biti dovolj obširen, da je tematika jasno prikazana in razumljiva domačemu in tujemu bralcu. Dati mora informacijo o namenu, metodi, rezultatu in zaključkih. Okvirno naj povzetek zajema 10 do 20 % obsega razprave oziroma članka.

7. IZVLEČEK

Izveček mora podati jedrnato informacijo o namenu in zaključkih razprave ali članka. Napisan mora biti v slovenskem in angleškem jeziku.

8. KLJUČNE BESEDE

Število ključnih besed naj ne presega 10 besed. Predstaviti morajo področje raziskave, podane v razpravi ali članku. Napisane morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku.

9. NASLOV RAZPRAVE ALI ČLANKA

Naslov razprave ali članka naj bo kratek in razumljiv. Za naslovom sledi ime/imena avtorja/avtorjev (ime in priimek).

10. NASLOV AVTORJA/AVTORJEV

Pod ključnimi besedami spodaj je naslov avtorja/avtorjev, in sicer akademski naslov, ime, priimek, ustanova, mesto z oznako države in poštno številko, država, ali elektronski poštni naslov.

11. UVOD

Uvod se mora nanašati le na vsebino razprave ali članka.

12. ZAKLJUČKI ALI SKLEPI

Zaključki ali sklepi morajo vsebovati sintezo glavnih ugotovitev glede na zastavljena vprašanja in razrešujejo ali nakazujejo problem raziskave.

13. TABELE, TABLE, GRAFIKONI, SLIKE IPD.

Tabele, table, grafikoni, slike ipd. v razpravi ali članku naj bodo jasne, njihovo mesto mora biti nedvoumno označeno, njihovo število naj racionalno ustreza vsebini. Tabele, table, slike, ilustracije, grafikoni ipd. skupaj z naslovi naj bodo priloženi na posebnih listih. Če so slike v

digitalni obliki, morajo biti pripravljene u zapisu .tiff v barvni skali CMYK in resoluciji vsaj 300 DPI/inch. Risanje slike pa v zapisu .eps.

Pri fitocenoloških tabelah se tam, kjer ni zastopana rastlinska vrsta, natisne pika.

14. LITERATURA IN VIRI

Uporabljeno literaturo citiramo med besedilom. Citirane avtorje pišemo v kapitelkah. Enega avtorja pišemo » (Priimek leto)« ali » (Priimek leto: strani)« ali »Priimek leto« [npr. (BUKRY 1974) ali (OBERDORFER 1979: 218) ali ... POLDINI (1991) ...]. Če citiramo več del istega avtorja, objavljenih v istem letu, posamezno del označimo po abecednem redu »Priimek leto mala črka« [npr. ...HORVATIĆ (1963 a)... ali (HORVATIĆ 1963 b)]. Avtorjem z enakim priimkom dodamo pred priimkom prvo črko imena (npr. R. TUXEN ali J. TUXEN). Več avtorjev istega dela citiramo po naslednjih načelih: delo do treh avtorjev »Priimek, Priimek & Priimek leto: strani« [npr. (SHEARER, PAPIKE & SIMON 1984) ali PEARCE & CANN (1973: 290-300)...]. Če so več kot trije avtorji, citiramo »Priimek prvega avtorja et al. leto: strani« ali »Priimek prvega avtorja s sodelavci leto« [npr. NOLL et al. 1996: 590 ali ...MEUSEL s sodelavci (1965)].

Literaturo uredimo po abecednem redu. Imena avtorjev pišemo v kapitelkah:

– Razprava ali članek:

DAKSKOBLER, L., 1997: *Geografske variante asociacije Sesleria autumnalis-Fagetum (Ht.) M. Wraber ex Borhidi 1963. Razprave IV razreda SAZU* (Ljubljana) 38 (8): 165–255.

KAJFEŽ, L. & A. HOČEVAR, 1984: *Klima. Tlatvorni činitelji*. V D. Stepančič: *Komentar k listu Murska Sobota*. Osnovna pedološka karta SFRJ. Pedološka karta Slovenije 1:50.000 (Ljubljana): 7–9.

LE LOEUFF, J., E. BUFFEAUT, M. MARTIN & H. TONG, 1993: *Decouverte d'Hadrosauridae (Dinosauria, Ornithischia) dans le Maastrichtien des Corbieres (Aude, France)*. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Ser. II: 1023–1029.

– Knjiga:

GORTANI, L. & M. GORTANI, 1905: *Flora Friuliana*. Udine.

Če sta različna kraja založbe in tiskarne, se navaja kraj založbe.

– Elaborat ali poročilo:

PRUS, T., 1999: *Tla severne Istre*. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. Center za pedologijo in varstvo okolja. Oddelek za agronomijo. Ljubljana. (Elaborat, 10 str.).

– Atlasi, karte, načrti ipd.:

KLIMATOLOGIJA Slovenije 1988: Prvi zvezek: *Temperatura zraka 1951–1980*. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

LETNO poročilo meteorološke službe za leto 1957. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

Za vire veljajo enaka pravila kot za literaturo.

15. LATINSKA IMENA TAKSONOV

Latinska imena rodov, vrst in infraspecifičnih taksonov se pišejo kurzivno. V fitocenoloških razpravah ali člankih se vsi sintaksoni pišejo kurzivno.

16. FORMAT IN OBLIKA RAZPRAVE ALI ČLANKA

Članek naj bo pisan v formatu RTF z medvrstičnim razmikom 1,5 na A4 (DIN) formatu. Uredniku je treba oddati izvirnik in kopijo ter zapis na disketi 3,5 ali na CD-ROM-u. Tabele in slike so posebej priložene tekstu. Slike so lahko priložene kot datoteke na CD-ROM-u, za podrobnosti se vpraša uredništvo.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Folia biologica et geologica is a scientific periodical of the Classis IV: Natural history that publishes natural scientific proceedings and review articles referring mainly to researches in ethnic region of ours, and also in Europe and elsewhere being of importance, necessity and comparison to our researches.

1. SCIENTIFIC TREATISE

It is the entire description of novel research including the theoretical review of the subjects, presenting in detail the results, conclusions, and the survey of literature of the authors cited. In exceptional cases the survey of literature may be replaced by sources, if the purport requires it.

It should be composed in classic manner: introduction, material and methods, results, discussion with conclusions, acknowledgments, literature, etc.

The treatise should not be longer than 30 pages, including tables, graphs, figures and others. Much desired are treatises of 20 pages.

The treatises are reviewed by two reviewers, one of them being member of SASA as a rule, the other one a foreign expert.

The reviewers are confirmed by the Classis IV SASA upon the proposal of the editorial board of *Folia biologica et geologica*.

The treatise shall be printed when adopted upon the proposal of the editorial board by Classis IV and the Presidency SASA.

2. REVIEW ARTICLE

On consultation with the editorial board and the author, the review article shall be published. Classis IV and the Presidency SASA upon the proposal of the editorial board adopt it. It should not be longer than 50 pages.

3. NEWS

The periodical publishes short, scientifically relevant and topical articles up to 7000 characters in length.

4. NOVELTY OF THE CONTRIBUTION

The treatise or article ought not to be published previously in other periodicals or books.

5. LANGUAGE

The treatise or article may be written in one of world language and in Slovenian language especially when the subjects are of local character.

The author of the treatise or article provides the translation into Slovenian language and corresponding editing, unless otherwise agreed by the editorial board.

6. SUMMARY

When the treatise or article is written in Slovenian, the summary should be in English. When they are in foreign language, the summary should be in Slovenian. It should be so extensive that the subjects are clear and understandable to domestic and foreign reader. It should give the information about the intention, method, result, and conclusions of the treatise or article. It should not be longer than 10 to 20% of the treatise or article itself.

7. ABSTRACT

It should give concise information about the intention and conclusions of the treatise or article. It must be written in English and Slovenian.

8. KEY WORDS

The number of key words should not exceed 10 words. They must present the topic of the research in the treatise or article and written in English and Slovenian.

9. TITLE OF TREATISE OR ARTICLE

It should be short and understandable. It is followed by the name/names of the author/authors (name and surname).

10. ADDRESS OF AUTHOR/AUTHORS

The address of author/authors should be at the bottom of the page: academic title, name, surname, institution, town and state mark, post number, state, or e-mail of the author/authors.

11. INTRODUCTION

Its contents should refer to the purports of the treatise or article only.

12. CONCLUSIONS

Conclusions ought to include the synthesis of the main statements resolving or indicating the problems of the research.

13. TABLES, GRAPHS, FIGURES, ETC.

They should be clear, their place should be marked unambiguously, and the number of them must rationally respond to the purport itself. Tables, figures, illus-

trations, graphs, etc. should be added within separated sheets. In case that pictures in digital form, **TIFF** format and **CMYK** colour scale with **300 DPI/inch** resolution should be used. For drawn pictures, **EPS** format should be used.

In cases, when certain plant species are not represented, a dot should be always printed in phytocenologic tables.

14. LITERATURE AND SOURCES

The literature used is to be cited within the text. The citation of the authors is to be marked in capitals. One writes the single author as follows: "(Surname year)" or "(Surnameyear:pages)" or "Surnameyear" [(BUKRY 1974) or (OBERDORFER 1979: 218) or ... POLDINI (1991)...]. The works of the same author are to be cited in alphabetical order: "Surnameyear small letter" [...HORVATIĆ (1963 a)... or (HORVATIĆ (1963 b)]. The first letter of the author's name is to be added when the surname of several authors is the same (R. TUXEN or J. TUXEN). When there are two or three authors, the citation is to be as follows: "Surname, Surname & Surname year: pages" [(SHEARER, PAPIKE & SIMON 1984) or PEARCE & CANN (1973: 290-300)...]. When there are more than three authors, the citation is to be as follows: "Surname of the first one et al. year: pages" or "Surname of the first one with collaborators year" [NOLL et al. 1996: 590 or MEUSEL with collaborators (1965)].

The literature is to be cited in alphabetical order. The author's name is written in capitals as follows:

– Treatise or article:

DAKSKOBLER, L., 1997: *Geografske variante asociacije Seslerio autumnalis-Fagetum (Ht.) M. Wraber ex Borhidi 1963. Razprave IV. Razreda SAZU* (Ljubljana) 38 (8): 165-255.

KAJFEŽ, L. & A. HOČEVAR, 1984: *Klima. Tlatvorni činitelji. V D. Stepančič: Komentar k listu Murska Sobota. Osnovna pedološka karta SFRJ. Pedološka karta Slovenije 1:50.000* (Ljubljana): 7–9.

LE LOEUFF, J., E. BUFFEAUT, M. MARTIN & H. TONG, 1993: *Découverte d'Hadrosauridae (Dinosauria, Ornithischia) dans le Maastrichtien des Corbieres (Aude, France)*. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Ser. II: 1023-1029.

– Book:

GORTANI, L. & M. GORTANI, 1905: *Flora Friuliana*. Udine.

In case that the location of publishing and printing are different, the location of publishing is quoted.

– Elaborate or report:

PRUS, T., 1999: *Tla severne Istre*. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. Center za pedologijo in varstvo okolja. Oddelek za agronomijo. Ljubljana. (Elaborat, 10 str.).

– Atlases, maps, plans, etc.:

KLIMATOLOGIJA Slovenije 1988: Prvi zvezek: *Temperatura zraka 1951-1980*. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

LETNO poročilo meteorološke službe za leto 1957. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

The same rules hold for sources.

15. LATIN NAMES OF TAXA

Latin names for order, series, and infraspecific taxa are to be written in italics. All syntaxa written in phytocoenological treatises or articles are to be in italics.

16. SIZE AND FORM OF THE TREATISE OR ARTICLE

The contribution should be written in RTF format, spacing lines 1.5 on A4 (DIN) size. The original and copy ought to be sent to the editor on diskette 3.5 or on CD-Rom. Tables and figures are to be added separately. Figures may be added as files on CD-Rom. The editorial board is to your disposal giving you detailed information.

17. THE TERM OF DELIVERY

The latest term to deliver your contribution is May 31.

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA 57/2 - 2016
Slovenska akademija znanosti in umetnosti v Ljubljani

Grafična priprava za tisk
Medija grafično oblikovanje, d.o.o.

Tisk
Abo Grafika d.o.o.

Ljubljana
2016